



Departamento de Farmacología y Terapéutica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

***“Nueva generación de bloqueantes  
del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$   
mitocondrial inspirados en  
CGP37157:  
Síntesis y Neuroprotección”***

**TESIS DOCTORAL**

**Francisco Javier Martínez Sanz**

**Directores**

**Dr. Cristóbal de los Ríos Salgado**

**Dra. María Francisca Cano Abad**

Trabajo realizado en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento  
Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, UAM  
Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de La Princesa

Madrid, 2015

[www.acdilaus.com](http://www.acdilaus.com)





Departamento de Farmacología y Terapéutica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

***Nueva generación de bloqueantes del  
intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial inspirados  
en CGP37157:  
Síntesis y Neuroprotección***

Memoria que presenta **Francisco Javier Martínez Sanz**  
para optar al Grado de Doctor

Directores

Dr. Cristóbal de los Ríos Salgado

Dra. María Francisca Cano Abad

Trabajo realizado en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento

Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, UAM

Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario de La Princesa

Madrid, 2015







Departamento de Farmacología y Terapéutica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

Don **CRISTÓBAL DE LOS RÍOS SALGADO**, investigador postdoctoral "Miguel Servet" del Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital Universitario de La Princesa de Madrid, y,

Doña **MARÍA FRANCISCA CANO ABAD**, profesora contratada doctora de la Universidad Autónoma de Madrid, CERTIFICAN:

Que Don **FRANCISCO JAVIER MARTÍNEZ SANZ**, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación *“Nueva generación de bloqueantes del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial inspirados en CGP37157: Síntesis y Neuroprotección”* con objeto de obtener el Grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Como directores del trabajo hacemos constar que ha sido realizado con todas las garantías técnicas y metodológicas, y que las conclusiones obtenidas son plenamente válidas, siendo considerado por tanto, apto para ser presentado como Tesis Doctoral.

Para que conste a efectos oportunos, expiden y firman la presente en Madrid a 9 de Junio de 2015.

Dr. Cristóbal de los Ríos Salgado

Dra. María Francisca Cano Abad

Investigador Postdoctoral "Miguel Servet"

Profa. Contratada Doctora



*"Una estructura conocida, pero aún no sintetizada, es para el químico lo que para otros hombres puede representar una montaña todavía no escalada, un mar no surcado, un campo nunca cultivado o un planeta aún no alcanzado".*

R. B. Woodward. Premio Nobel de Química 1965

*"Es preciso sacudir enérgicamente el bosque de las neuronas cerebrales adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas inquietudes."*

S. Ramón y Cajal. Premio Nobel de Medicina 1906



*A mis padres, por su apoyo constante*

*A Jose y Silvia*

*A mi sobrino Eder*

*A mis abuelos; Eliseo, Conce y Pepe*



# Agradecimientos

---

Siempre he considerado que la peor parte de la escritura de la Tesis Doctoral eran los agradecimientos, debido a que son tantas las personas que durante tantos años te acompañan en el camino, que no quieres olvidarte de nadie en este preciso momento. Por ello, quiero empezar dando las gracias a todos los que, mientras duraba este proceso de investigación, se han cruzado en mi camino. Gracias, de corazón, a todos.

Comenzaré con mis directores de tesis, ellos han estado conmigo en cada momento, apoyándome con sus palabras y sus comentarios, tanto constructivos como "reconstructivos". Al **Dr. Cristóbal de los Ríos Salgado**, por haberme abierto las puertas al mundo de la investigación en Química Médica, un mundo apasionante y con mucho camino por hacer. Gracias por confiar en mí y haberme enseñado más química de la que sabía. A la **Dra. María F. Cano Abad**, por haberme enseñado todo lo que sé sobre  $\text{Ca}^{2+}$ , células HeLa, mitocondria y eucorinas. Llegué al laboratorio pensando que el  $\text{Ca}^{2+}$ , un catión del grupo 2 alcalinotérreos, únicamente era capaz de tener enlace iónico con los elementos de los grupos 16 - 17, y me voy sabiendo que estas palabras las escribo gracias a que el  $\text{Ca}^{2+}$  interviene en ese proceso. Gracias, **Dr. de los Ríos** y **Dra. Cano** por todo lo que me habéis enseñado, aportado y compartido en esos cafés científicos que teníamos para estudiar los datos y que tan buenos resultados han dado.

Al **Dr. Antonio G. García**, por haberme abierto las puertas del Instituto Teófilo Hernando, y haber podido realizar la tesis doctoral en este instituto de investigación. A la **Dra. Mercedes Villarroya**, por haberme dado consejo y ayuda en los momentos más adecuados, y por sus siempre bien recibidas correcciones de "abstract" de congresos. Gracias a los dos.

A mis compañeros del laboratorio L8-ITH4, **Laura, María, Rafa, Rocío**, muchísimas gracias por vuestra compañía en el laboratorio, por soportar el "olor" de mis reacciones con metiltioglicolato. Vuestras palabras de apoyo, las risas que teníamos en los momentos de la comida, las confidencias en la unidad de cultivo, las mañanas enteras delante de la vitrina de química hablando y comentando las pequeñas cosas que nos iban pasando durante la semana. Muchas gracias a todos, en especial a Laura, que gracias a ella, parte de esta tesis ha sido posible, por su ayuda y por su trabajo. Laura, gracias a ti puede ser zen muchas veces.

A mis compañeros del L3-ITH2, **Elisa, Esther, Izaskun, Javi, Vanesa**, gracias por las risas, los cafés, las comidas, las cañas en el "Rosario" al terminar la jornada laboral. Por vuestro apoyo, consejos y ánimo antes de cada SEDITH, antes de cada charla en un congreso. Vuestras palabras y miradas de ánimo siempre ayudan en esos momentos. No sé que más decir chicos, todos sabéis lo duro que es este mundo.

A los compañeros del L9-ITH5 del Hospital Universitario de La Princesa, **Ana, Ana José y María** gracias por todos los momentos que me habéis dado en la campana de cultivo, en la máquina de café y en el despacho. Gracias por apoyarme cuando las células no respondían a  $\text{Ca}^{2+}$  y aconsejarme lo que debía hacer.

Tampoco me quiero olvidar del resto de compañeros de otros laboratorios, **Jonal, Marcos y Ricardo**, de gente que ya terminó sus estudios de doctorado, pero con la que sigo en contacto y me siguen animando, **Alicia, Ángela y Lola**, muchas gracias por toda la ayuda y consejos prestados.

También quiero agradecer a la FTH y al Instituto de Salud Carlos III bajo los programas CIEN, Miguel Servet y FIS, por su ayuda económica prestada mediante la cual he podido terminar mis estudios de doctorado. Igualmente, a todo el personal de gestión, **Antonio Manuel, Arturo, María**



**José**, gracias por todo. A **Irene, María, Teresa, Rocío** del Servicio de Farmacología Clínica del hospital, gracias por vuestro animo y apoyo.

A antiguos compañeros de la PPQF, **Inés, Mónica, Naiara y Pedro**, de vosotros aprendí el mundo del escalado de fármacos. A compañeros de la UCIIM, **Belén, Jesús y Noemí**, por vuestro constante apoyo cuando más lo necesité.

A mis amigos de siempre, los de la facultad, Madrid y San Agustín, **Adrian, Carlos, David, Edu, Elena, María José, Raúl, Vanesa, Virginia, Yanira, Ana, Cris, Cristina, Marta, Gabi, Ricardo, Alberto, Celia, Cristina, Esther, Marina, Marta y Mireia**. GRACIAS A TODOS, por preguntarme, soportarme, darme consejos y escucharme cuando todo lo veía gris, y solo con vuestras sonrisas y consejos hacíais que todo lo volviera a ver de un arco iris maravilloso.

Y por último, a mi MARAVILLOSA Y EXTENSA FAMILIA. Gracias **papá y mamá** por apoyarme cuando dije que quería hacer la tesis doctoral, por todo el esfuerzo que habéis realizado, y por todos los valores que me habéis enseñado, gracias a vosotros he conseguido ser la persona que soy hoy en día. A mi hermano **Jose**, mi cuñada **Silvia** y mi sobrino **Eder** por todo lo que me aportáis en la vida. Sé que mucha de mi familia hoy no podrá estar conmigo en la lectura/defensa de la tesis, pero sé que me estarán apoyando y enviándome su fuerza para sacar este proyecto adelante. Muchísimas gracias **Familia Martínez**, de corazón, por todo el apoyo que me dais y me habéis dado, en cada reunión familiar para celebrar un cumpleaños, alguna fiesta o simplemente por el placer de juntarnos y estar "casi" toda la familia junta. Esos momentos hicieron más llevadero este largo proceso.



# Índice

---

<b>Listado de abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Glosario de estructuras</b>	<b>9</b>
<b>Financiación</b>	<b>11</b>

## 1. - Introducción

<b>1.1. - Calcio: segundo mensajero</b>	<b>15</b>
<b>1.2. - Mitocondria</b>	<b>17</b>
<i>1.2.1. - Compuestos que actúan a nivel mitocondrial</i>	19
<b>1.3. - Enfermedades neurodegenerativas y alteración del <math>\text{Ca}^{2+}</math> celular</b>	<b>23</b>
<i>1.3.1. - <math>\text{Ca}^{2+}</math> y Enfermedad de Alzheimer</i>	27
<i>1.3.2. - <math>\text{Ca}^{2+}</math> y Enfermedad de Parkinson</i>	30
<i>1.3.3. - <math>\text{Ca}^{2+}</math> y Esclerosis Lateral Amiotrófica</i>	33
<i>1.3.4. - <math>\text{Ca}^{2+}</math> y Enfermedad de Huntington</i>	36
<i>1.3.5. - <math>\text{Ca}^{2+}</math> y Ataxias Espinocerebelosas</i>	38
<b>1.4. - Fármacos moduladores de la señal celular de <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>	<b>40</b>
<b>1.5. - Benzotiazepinas</b>	<b>43</b>
<i>1.5.1. - Métodos de síntesis</i>	46
<i>1.5.2. - Farmacomodulación de las benzotiazepinas</i>	48
<b>1.6. - CGP37157 como bloqueante del intercambiador <math>\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}</math> mitocondrial</b>	<b>51</b>
<i>1.6.1. - Descubrimiento del mNCX</i>	51

<b>1.7. - Bibliografía</b>	<b>59</b>
<b>2. - Hipótesis</b>	
<b>2.1. - Hipótesis de la tesis</b>	<b>73</b>
<b>2.2. - Bibliografía</b>	<b>75</b>
<b>3. - Marco de la tesis y objetivos</b>	
<b>3.1. - Marco de la tesis y objetivos</b>	<b>79</b>
<i>3.1.1. - Marco en el que se desarrolla esta tesis doctoral</i>	79
<i>3.1.2. - Objetivos</i>	80
<b>4. - Procedimiento experimental</b>	
<b>4.1. - Materiales de síntesis y métodos de caracterización</b>	<b>87</b>
<i>4.1.1. - Materiales utilizados</i>	87
<i>4.1.2. - Métodos experimentales de caracterización estructural</i>	87
<u>4.1.2.1. Análisis elemental y Puntos de fusión</u>	87
<u>4.1.2.2. Espectroscopía de Infrarrojos</u>	88
<u>4.1.2.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear</u>	88
<u>4.1.2.4. Espectrometría de Masas</u>	89
<b>4.2. - Síntesis de 4,1-benzotiazepinas y 4,1-piridotiazepinas análogas a CGP37157</b>	<b>89</b>
<i>4.2.1. - Síntesis de intermedios de partida</i>	89
<u>4.2.1.1. Síntesis de 2-isopropilbenzaldehído (1)</u>	89
<u>4.2.1.2. Síntesis de 4-cloro-N-tert-butoxicarbonilánilina (2)</u>	90
<u>4.2.1.3. Síntesis de N-(cloropiridín-2-il)pivaloamida (3)</u>	90
<i>4.2.2. - Síntesis 4,1-benzotiazepinas análogas a CGP37157</i>	91

4.2.2.1. - Procedimiento general para la síntesis de 4-cloro-2-[hidroxi(aril)metil]-N-tert-butoxicarbonilnilina (4-14)	91
4.2.2.1.i. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-metilfenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilnilina (4)	92
4.2.2.1.ii. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-bromofenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilnilina (5)	92
4.2.2.1.iii. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-clorofenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilnilina (6)	92
4.2.2.1.iv. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-trifluorometilfenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilnilina (7)	93
4.2.2.1.v. 4-cloro-2-[hidroxi(2',6'-diclorofenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilnilina (8)	93
4.2.2.1.vi. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-metoxifenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilnilina (9)	93
4.2.2.1.vii. 4-cloro-2-[hidroxi(4'-metoxifenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilnilina (10)	94
4.2.2.1.viii. 4-cloro-2-[hidroxi(fenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilnilina (11)	94
4.2.2.1.ix. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-isopropilfenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilnilina (12)	94
4.2.2.1.x. 4-cloro-2-[hidroxi(4'-fluorofenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilnilina (13)	95
4.2.2.1.xi. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-etoxifenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilnilina (14)	95
4.2.2.2. - Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-(aril)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (15-25)	95
4.2.2.2.i. 7-cloro-5-(2'-metilfenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (15)	96
4.2.2.2.ii. 7-cloro-5-(2'-bromofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (16)	96
4.2.2.2.iii. 7-cloro-5-(2'-clorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (17)	97
4.2.2.2.iv. 7-cloro-5-(2'-trifluorometilfenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (18)	97
4.2.2.2.v. 7-cloro-5-(2',6'-diclorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (19)	98
4.2.2.2.vi. 7-cloro-5-(2'-metoxifenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (20)	98
4.2.2.2.vii. 7-cloro-5-(4'-metoxifenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (21)	99
4.2.2.2.viii. 7-cloro-5-fenil-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (22)	99
4.2.2.2.ix. 7-cloro-5-(2'-isopropilfenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (23)	100
4.2.2.2.x. 7-cloro-5-(4'-fluorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (24)	100
4.2.2.2.xi. 7-cloro-5-(2'-etoxifenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (25)	101
4.2.3. - Síntesis 4,1-piridotiazepinas análogas a CGP37157	101
4.2.3.1. - Procedimiento general para la síntesis de N-(5-cloro-3-[hidroxi(aril)piridín-2-il]pivaloamida (26-36)	101
4.2.3.1.i. N-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-trifluorometilfenil)piridín-2-il]pivaloamida (26)	102
4.2.3.1.ii. N-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-metoxifenil)piridín-2-il]pivaloamida (27)	102
4.2.3.1.iii. N-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-metilfenil)piridín-2-il]pivaloamida (28)	103
4.2.3.1.iv. N-(5-cloro-3-[hidroxi(4'-metoxifenil)piridín-2-il]pivaloamida (29)	103
4.2.3.1.v. N-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-etoxifenil)piridín-2-il]pivaloamida (30)	103
4.2.3.1.vi. N-(5-cloro-3-[hidroxi(fenil)piridín-2-il]pivaloamida (31)	103

<u>4.2.3.1.vii. <i>N</i>-(5-cloro-3-[hidroxi(4'-fluorofenil)]piridín-2-il)pivaloamida (32)</u>	104
<u>4.2.3.1.viii. <i>N</i>-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-isopropilfenil)]piridín-2-il)pivaloamida (33)</u>	104
<u>4.2.3.1.ix. <i>N</i>-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-clorofenil)]piridín-2-il)pivaloamida (34)</u>	104
<u>4.2.3.1.x. <i>N</i>-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-bromofenil)]piridín-2-il)pivaloamida (35)</u>	105
<u>4.2.3.1.xi. <i>N</i>-(5-cloro-3-[hidroxi(2',6'-diclorofenil)]piridín-2-il)pivaloamida (36)</u>	105
 <i>4.2.3.2. - Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(aril)metanol</i> <b>(37-47)</b>	105
<u>4.2.3.2.i. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-trifluorometilfenil)metanol (37)</u>	106
<u>4.2.3.2.ii. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-metoxifenil)metanol (38)</u>	106
<u>4.2.3.2.iii. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-metilfenil)metanol (39)</u>	106
<u>4.2.3.2.iv. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(4'-metoxifenil)metanol (40)</u>	106
<u>4.2.3.2.v. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-etoxifenil)metanol (41)</u>	107
<u>4.2.3.2.vi. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(fenil)metanol (42)</u>	107
<u>4.2.3.2.vii. 4 (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(4'-fluorofenil)metanol (43)</u>	107
<u>4.2.3.2.viii. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-isopropilfenil)metanol (44)</u>	108
<u>4.2.3.2.ix. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-clorofenil)metanol (45)</u>	108
<u>4.2.3.2.x. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-bromofenil)metanol (46)</u>	108
<u>4.2.3.2.xi. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2',6'-diclorofenil)metanol (47)</u>	109
 <i>4.2.3.3. - Procedimiento general para la síntesis de 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(aril)metiltio)acetato de metilo (48-58)</i>	109
<u>4.2.3.3.i. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-trifluorometilfenil)metiltio)acetato de metilo (48)</u>	110
<u>4.2.3.3.ii. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-metoxifenil)metiltio)acetato de metilo (49)</u>	110
<u>4.2.3.3.iii. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-metilfenil)metiltio)acetato de metilo (50)</u>	110
<u>4.2.3.3.iv. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(4'-metoxifenil)metiltio)acetato de metilo (51)</u>	111
<u>4.2.3.3.v. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-etoxifenil)metiltio)acetato de metilo (52)</u>	111
<u>4.2.3.3.vi. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(fenil)metiltio)acetato de metilo (53)</u>	111
<u>4.2.3.3.vii. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(4'-fluorofenil)metiltio)acetato de metilo (54)</u>	112
<u>4.2.3.3.viii. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-isopropilfenil)metiltio)acetato de metilo (55)</u>	112
<u>4.2.3.3.ix. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-clorofenil)metiltio)acetato de metilo (56)</u>	112
<u>4.2.3.3.x. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-bromofenil)metiltio)acetato de metilo (57)</u>	113
<u>4.2.3.3.xi. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2',6'-diclorofenil)metiltio)acetato de metilo (58)</u>	113
 <i>4.2.3.4. - Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-(aril)-3,5-dihidropirido [2,3-<i>e</i>] [4,1]tiazepin-2(1<i>H</i>)-ona (59-69)</i>	113

<u>4.2.3.4.i. 7-cloro-5-(2'-trifluorometilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-<i>e</i>][4,1]tiazepin-2(1<i>H</i>)-ona (59)</u>	114
<u>4.2.3.4.ii. 7-cloro-5-(2'-metoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-<i>e</i>][4,1]tiazepin-2(1<i>H</i>)-ona (60)</u>	114
<u>4.2.3.4.iii. 7-cloro-5-(2'-metilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-<i>e</i>][4,1]tiazepin-2(1<i>H</i>)-ona (61)</u>	115
<u>4.2.3.4.iv. 7-cloro-5-(4'-metoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-<i>e</i>][4,1]tiazepin-2(1<i>H</i>)-ona (62)</u>	115
<u>4.2.3.4.v. 7-cloro-5-(2'-etoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-<i>e</i>][4,1]tiazepin-2(1<i>H</i>)-ona (63)</u>	116
<u>4.2.3.4.vi. 7-cloro-5-fenil-3,5-dihidropirido[2,3-<i>e</i>][4,1]tiazepin-2(1<i>H</i>)-ona (64)</u>	116
<u>4.2.3.4.vii. 7-cloro-5-(4'-fluorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-<i>e</i>][4,1]tiazepin-2(1<i>H</i>)-ona (65)</u>	117
<u>4.2.3.4.viii. 7-cloro-5-(2'-isopropilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-<i>e</i>][4,1]tiazepin-2(1<i>H</i>)-ona (66)</u>	117
<u>4.2.3.4.ix. 7-cloro-5-(2'-clorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-<i>e</i>][4,1]tiazepin-2(1<i>H</i>)-ona (67)</u>	118
<u>4.2.3.4.x. 7-cloro-5-(2'-bromofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-<i>e</i>][4,1]tiazepin-2(1<i>H</i>)-ona (68)</u>	118
<u>4.2.3.4.xi. 7-cloro-5-(2',6'-diclorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-<i>e</i>][4,1]tiazepin-2(1<i>H</i>)-ona (69)</u>	119
 <b>4.3. - Materiales y métodos de evaluación farmacológica</b>	<b>119</b>
4.3.1. - <i>Materiales utilizados</i>	119
4.3.2. - <i>Líneas celulares utilizadas</i>	120
<u>4.3.2.1. - Células SH-SY5Y</u>	120
<u>4.3.2.2. - Células HeLa</u>	121
4.3.3. - <i>Cultivo primario de células cromafín bovinas</i>	121
4.3.4. - <i>Preparación de rodajas de hipocampo de rata</i>	122
4.3.5. - <i>Determinación de la viabilidad celular mediante MTT</i>	123
4.3.6. - <i>Determinación de la viabilidad celular mediante LDH</i>	124
 <b>4.4. - Evaluación del perfil neuroprotector de los derivados de CGP37157</b>	<b>125</b>
4.4.1. - <i>Evaluación del perfil neuroprotector frente a veratridina</i>	125
4.4.2. - <i>Evaluación del perfil neuroprotector frente a 70 mM de K<sup>+</sup></i>	126
4.4.3. - <i>Evaluación en rodajas de hipocampo de rata frente a glutamato</i>	127
4.4.4. - <i>Evaluación del perfil neuroprotector frente a estrés oxidativo</i>	127
 <b>4.5. - Evaluación de los derivados de CGP37157 como bloqueantes del mNCX</b>	<b>128</b>

4.5.1. - Procedimiento experimental para la expresión y reconstitución de la AEQ en las células HeLa	130
4.5.2. - Evaluación de los compuestos en células HeLa intactas	131
4.5.3. - Evaluación de los compuestos frente al bloqueo del mNCX en mitocondrias "in situ"	132
<b>4.6. - Análisis estadístico</b>	<b>135</b>
<b>4.7. - Bibliografía</b>	<b>136</b>

## 5. - Resultados y discusión

<b>5.1. - Síntesis de 4,1-benzotiazepinas análogas a CGP37157</b>	<b>141</b>
5.1.1. - Evaluación de la síntesis	141
5.1.2. - Caracterización analítica	146
5.1.3. - Caracterización estructural	146
5.1.3.1. - Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H}$ -RMN)	147
5.1.3.2. - Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN)	148
5.1.3.3. - Espectroscopía de Infrarrojos (FTIR)	149
5.1.3.4. - Espectrometría de Masas con la técnica de Electrospray (APIES <sup>+</sup> )	150
<b>5.2. - Síntesis de 4,1-piridotiazepinas análogas a CGP37157</b>	<b>150</b>
5.2.1. - Evaluación de la síntesis	150
5.2.2. - Caracterización analítica	155
5.2.3. - Caracterización estructural	155
5.2.3.1. - Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H}$ -RMN)	155
5.2.3.2. - Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN)	158
5.2.3.3. - Espectroscopía de Infrarrojos (FTIR)	158
5.2.3.4. - Espectrometría de Masas con la técnica de Electrospray (APIES <sup>+</sup> )	159
<b>5.3. - Evaluación del perfil neuroprotector de los derivados de CGP37157</b>	<b>159</b>
5.3.1. - Evaluación del perfil neuroprotector frente a veratridina	159



5.3.1.1. - Evaluación de los derivados bencénicos (15-25)	160
5.3.1.2. - Evaluación de los derivados piridínicos (59-69)	164
5.3.2. - Evaluación del perfil neuroprotector frente a 70 mM de $K^+$	165
5.3.2.1. - Evaluación de los derivados bencénicos (15-25)	167
5.3.2.2. - Evaluación de los derivados piridínicos (59-69)	168
5.3.3. - Evaluación en rodajas de hipocampo de rata frente a glutamato	170
5.3.3.1. - Evaluación de los derivados bencénicos (15-25)	171
5.3.3.2. - Evaluación de los derivados piridínicos (59-69)	173
5.3.4. - Evaluación del perfil neuroprotector frente a estrés oxidativo	175
5.3.4.1. - Evaluación de los derivados bencénicos (15-25)	175
5.3.4.2. - Evaluación de los derivados piridínicos (59-69)	177
<b>5.4. - Evaluación de los derivados de CGP37157 como bloqueantes del mNCX</b>	<b>178</b>
5.4.1. - Evaluación de los compuestos en células HeLa intactas	178
5.4.1.1. - Evaluación de los derivados bencénicos (15-25)	182
5.4.1.2. - Evaluación de los derivados piridínicos (59-69)	184
5.4.2. - Evaluación de los compuestos frente al bloqueo del mNCX en mitocondrias "in situ"	185
5.4.2.1. - Evaluación del derivado bencénico (23)	189
5.4.2.2. - Evaluación del derivado piridínico (65)	191
<b>5.5. - Bibliografía</b>	<b>197</b>
<b>6. - Conclusiones</b>	
<b>6.1. - Conclusiones</b>	<b>203</b>
<b>7. - Bibliografía</b>	
<b>7.1. - Bibliografía</b>	<b>209</b>

## 8. - Anexos

<b>8.1. - Anexos</b>	<b>227</b>
8.1.1. - <i>Caracterización estructural de derivados bencénicos de CGP37157</i>	229
8.1.1.1. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del compuesto 2</i>	229
8.1.1.2. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del intermedio 12</i>	230
8.1.1.3. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del compuesto 23</i>	231
8.1.1.4. - <i>Espectroscopía de <math>^{13}\text{C}</math>-RMN del compuesto 23</i>	232
8.1.1.5. - <i>Espectroscopía de FTIR del compuesto 23</i>	233
8.1.2. - <i>Caracterización estructural de derivados piridínicos de CGP37157</i>	234
8.1.2.1. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del compuesto 3</i>	234
8.1.2.2. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del intermedio 32</i>	235
8.1.2.3. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del intermedio 43</i>	236
8.1.2.4. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del intermedio 54</i>	237
8.1.2.5. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del compuesto 65</i>	238
8.1.2.6. - <i>Espectroscopía de <math>^{13}\text{C}</math>-RMN del compuesto 65</i>	239
8.1.2.7. - <i>Espectroscopía de FTIR del compuesto 65</i>	240

# Listado de abreviaturas y acrónimos

---

## A

$\alpha$ -sin:  $\alpha$ -Sinucleína.

ABC: Área bajo la curva.

AcOEt: Acetato de etilo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADN<sub>mit</sub>: ADN mitocondrial.

AEC: Ataxia espinocerebelosas.

AEQ<sub>Mit Mut</sub>: Ecuorina Mitocondrial Mutada.

AMPA: Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico.

A<sub>N</sub>: Adición nucleófila.

APP: Proteína precursora de  $\beta$ -amiloide, de sus siglas en ingles en inglés "*Amyloid Precursor Protein*".

ATP: Adenosín trifosfato, trifosfato de adenosina, de sus siglas en inglés "*Adenosine Triphosphate*".

## B

$\beta$ A:  $\beta$ -Amiloide.

*n*-BuLi: *n*-Butillitio.

$t$ BuLi: *tert*-Butyllitio.

Boc<sub>2</sub>O: Dicarbonato de di-*tert*-butilo.

bs: Singlete ancho, multiplicidad de  $^1\text{H}$  en RMN.

## C

c: Cuartete; multiplicidad de  $^1\text{H}$  en RMN.

$\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ :  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.

$\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ :  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial.

$[\text{Ca}^{2+}]$ : Concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ .

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ : Concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ : Concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial.

CCK: Receptor de colecistoquinina, por sus siglas en inglés "*Cholecystokinin receptor*".

CCCP: Carbonil cianina *m*-clorofenilhidrazona.

CCVD;  $\text{Ca}_v$ : Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes.

$\text{CDCl}_3$ : Cloroformo deuterado.

$\text{CE}_{50}$ : Concentración efectiva 50.

$\text{CI}_{50}$ : Concentración inhibitoria 50.

CGP37157: 7-cloro-5-(2'-clorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2-(3*H*)-ona.

CICR: Liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ , por sus siglas en inglés "*Calcium Induced Calcium Release*".

Cit.C: Citocromo C.

$\text{cm}^{-1}$ : Número de onda, magnitud de medida en FTIR.

CTE: Cadena de transporte electrónico.

## **D**

$\delta$ : Banda de flexión en FTIR.

$\delta$ : Desplazamiento químico en RMN.

$\Delta\Psi_m$ : Potencial de membrana mitocondrial.

d: Doblete, multiplicidad de  $^1\text{H}$  en RMN.

DA: Dopamina.

dd: Doble doblete, multiplicidad de  $^1\text{H}$  en RMN.

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco, por sus siglas en inglés "*Dulbecco's Modified Eagle Medium*".

DMF: Dimetilformamida.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

$\text{DMSO}_{d6}$ : Dimetilsulfóxido deuterado.

dt: Doble triplete, multiplicidad de  $^1\text{H}$  en RMN.

## **E**

EA: Enfermedad de Alzheimer.

EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético, por sus siglas en inglés "*Ethylenediaminetetraacetic acid*".

EH: Enfermedad de Huntington.

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica.

EMEM: Medio mínimo esencial de Eagle, por sus siglas en inglés "*Eagle's Minimal Essential Medium*".

EP: Enfermedad de Parkinson.

Et<sub>3</sub>N: Trietilamina.

Et<sub>2</sub>O: Dietil éter.

## **F**

FCCP: Carbonil cianina *p*-trifluorometoxifenilhidrazona.

FGI: Interconversión de grupo funcional, por sus siglas en inglés, "*Functional Group Interchange*".

FTIR: Espectroscopía de Infrarrojos por Transformada de Fourier.

## **G**

GABA: Ácido  $\gamma$ -aminobutírico.

Glu: Glutamato.

## **H**

6-HDA: 6-Hidroxidopamina.

HEPES: Ácido *N*-2-[4-(2-hidroxietil)piperazina-1-il] etanosulfónico.

hp: Heptete, multiplicidad de <sup>1</sup>H en RMN.

*Htt*: Proteína huntingtina.

*Htt<sup>exp</sup>*: Proteína huntingtina mutada.

Hz: Herzios.

## **I**

IECA: Inhibidor de la enzima conversiva de angiotensina.

IP<sub>3</sub>: Inositol-1,4,5-trifosfato, por sus siglas en inglés, "*Inositol trisphosphate*".

i.p.: Intraperitoneal.

## **J**

*J*: Constante de acoplamiento.

## **K**

KDa: Kilodalton.

## **L**

LDH: Lactato deshidrogenasa, de sus siglas en inglés "*Lactate Dehydrogenase*".

LiHDMS: bis-(trimetilsilil)amiduro de litio.

## **M**

μM: Micromolar;  $\times 10^{-6}$  M.

m: Multiplete, multiplicidad de <sup>1</sup>H en RMN.

MAO-B: Enzima monoamino oxidasa B.

MCU: Uniportador mitocondrial de Ca<sup>2+</sup>, de sus siglas en inglés "*Mitochondrial Calcium Uniporter*".

mM: Milimolar;  $\times 10^{-3}$  M.

mNCX: Intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, de sus siglas en inglés “*mitochondrial Sodium Calcium Exchanger*”.

MOB: Molécula objetivo.

MPP<sup>+</sup>: 1-Metil-4-fenilpiridinio.

mPTP: Poro de transición de la permeabilidad mitocondrial, por sus siglas en inglés “*mitochondrial Permeability Transition Pore*”.

MPTP: 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

MTT: Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-2H-tetrazolio.

## **N**

v: Banda de absorción en FTIR.

NCLX: Intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ , de sus siglas en inglés “*Sodium Calcium Lithium Exchanger*”.

NCX: Intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, de sus siglas en inglés “*Sodium Calcium Exchanger*”.

nM: Nanomolar;  $\times 10^{-9}$  M.

NM: Neurona motora.

NMDA: *N*-metil-*D*-aspartato.

## **O**

Olig. A: Oligomicina A.

## **P**

ppm: Partes por millón.



PTD: Fosfatidilserina.

## **R**

r-AMPA: Receptor de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico.

RE: Retículo endoplásmico.

r-IP<sub>3</sub>: Receptor de IP<sub>3</sub>.

r-nACh: Receptor nicotínico de acetilcolina.

r-NMDA: Receptor de *N*-metil-*D*-aspartato.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

ROS: Especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés "*Reactive Oxygen Species*".

Rot: Rotenona.

RuR: Rojo de Rutenio, de sus siglas en inglés "*Ruthenium Red*".

r-Ry: Receptor de Rianodina.

## **S**

s: Singlete, multiplicidad de <sup>1</sup>H en RMN.

SERCA: Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana del retículo endoplásmico, del inglés "*Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*".

SFB: Suero fetal bovino.

SIdI: Servicio Interdepartamental de Investigación.

S<sub>N</sub>: Sustitución nucleófila.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SOD-1: Enzima superóxido dismutasa 1.

## **T**

t: Triplete, multiplicidad de  $^1\text{H}$  en RMN.

TFA: Ácido trifluoroacético.

THF: Tetrahidrofurano.

TLC: Cromatografía en capa fina, de sus siglas en inglés "*Thin Layer Chromatography*".

TTX: Tetrodotoxina.

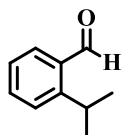
## **U**

uma: Unidades de masa atómica.

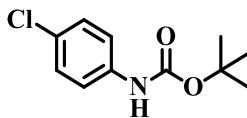
## **V**

VTD: Veratridina.

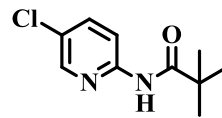
# Glosario de estructuras



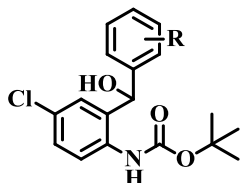
(1)



(2)



(3)

R = 2'-CH<sub>3</sub> (4)

R = 2'-Br (5)

R = 2'-Cl (6)

R = 2'-CF<sub>3</sub> (7)

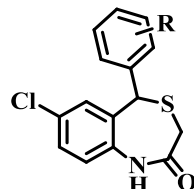
R = 2',6'-diCl (8)

R = 2'-OCH<sub>3</sub> (9)R = 4'-OCH<sub>3</sub> (10)

R = 2'-H (11)

R = 2'-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (12)

R = 4'-F (13)

R = 2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (14)R = 2'-CH<sub>3</sub> (15)

R = 2'-Br (16)

R = 2'-Cl (17)

R = 2'-CF<sub>3</sub> (18)

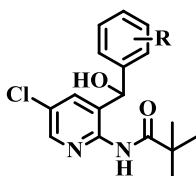
R = 2',6'-diCl (19)

R = 2'-OCH<sub>3</sub> (20)R = 4'-OCH<sub>3</sub> (21)

R = 2'-H (22)

R = 2'-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (23)

R = 4'-F (24)

R = 2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (25)R = 2'-CF<sub>3</sub> (26)R = 2'-OCH<sub>3</sub> (27)R = 2'-CH<sub>3</sub> (28)R = 4'-OCH<sub>3</sub> (29)R = 2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (30)

R = 2'-H (31)

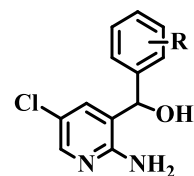
R = 4'-F (32)

R = 2'-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (33)

R = 2'-Cl (34)

R = 2'-Br (35)

R = 2',6'-diCl (36)

R = 2'-CF<sub>3</sub> (37)R = 2'-OCH<sub>3</sub> (38)R = 2'-CH<sub>3</sub> (39)R = 4'-OCH<sub>3</sub> (40)R = 2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (41)

R = 2'-H (42)

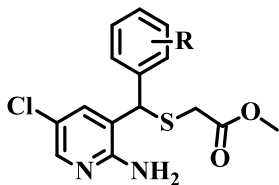
R = 4'-F (43)

R = 2'-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (44)

R = 2'-Cl (45)

R = 2'-Br (46)

R = 2',6'-diCl (47)

R = 2'-CF<sub>3</sub> (48)R = 2'-OCH<sub>3</sub> (49)R = 2'-CH<sub>3</sub> (50)R = 4'-OCH<sub>3</sub> (51)R = 2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (52)

R = 2'-H (53)

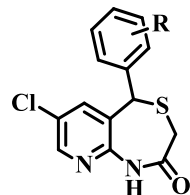
R = 4'-F (54)

R = 2'-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (55)

R = 2'-Cl (56)

R = 2'-Br (57)

R = 2',6'-diCl (58)

R = 2'-CF<sub>3</sub> (59)R = 2'-OCH<sub>3</sub> (60)R = 2'-CH<sub>3</sub> (61)R = 4'-OCH<sub>3</sub> (62)R = 2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (63)

R = 2'-H (64)

R = 4'-F (65)

R = 2'-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (66)

R = 2'-Cl (67)

R = 2'-Br (68)

R = 2',6'-diCl (69)



# Financiación

---

El trabajo contenido en esta Tesis ha sido financiado por:

(1) Fundación CIEN, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, N° PI16/09

(2) Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad, FIS N° PI13/00789;

(3) Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad Programa Miguel Servet, N° CPI01/00531

(4) Fundación Teófilo Hernando (FTH)

Durante la realización de esta Tesis doctoral, el doctorando ha sido beneficiario de una beca de investigación predoctoral de la Fundación CIEN del Instituto de Salud Carlos III y de una beca de la FTH a cargo de dos proyectos de investigación concedidos al Dr. D. Antonio García García, para la realización de investigación en el campo de las enfermedades neurodegenerativas.



# 1. - Introducción

---

<b>1.1. - Calcio: segundo mensajero</b>	<b>15</b>
<b>1.2. - Mitocondria</b>	<b>17</b>
<i>1.2.1. - Compuestos que actúan a nivel mitocondrial</i>	19
<b>1.3. - Enfermedades neurodegenerativas y alteración del <math>\text{Ca}^{2+}</math> celular</b>	<b>23</b>
<i>1.3.1. - <math>\text{Ca}^{2+}</math> y Enfermedad de Alzheimer</i>	27
<i>1.3.2. - <math>\text{Ca}^{2+}</math> y Enfermedad de Parkinson</i>	30
<i>1.3.3. - <math>\text{Ca}^{2+}</math> y Esclerosis Lateral Amiotrófica</i>	33
<i>1.3.4. - <math>\text{Ca}^{2+}</math> y Enfermedad de Huntington</i>	36
<i>1.3.5. - <math>\text{Ca}^{2+}</math> y Ataxias Espinocerebelosas</i>	38
<b>1.4. - Fármacos moduladores de la señal celular de <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>	<b>40</b>
<b>1.5. - Benzotiazepinas</b>	<b>43</b>
<i>1.5.1. - Métodos de síntesis</i>	46
<i>1.5.2. - Farmacomodulación de las benzotiazepinas</i>	48
<b>1.6. - CGP37157 como bloqueante del intercambiador <math>\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}</math> mitocondrial</b>	<b>51</b>
<i>1.6.1. - Descubrimiento del mNCX</i>	51
<b>1.7. - Bibliografía</b>	<b>59</b>





## 1. - Introducción

### 1.1. - Calcio: segundo mensajero

El ión calcio,  $\text{Ca}^{2+}$ , actúa como una señal intracelular muy versátil que origina gran cantidad de respuestas celulares, tan diversas como la exocitosis de un neurotransmisor, la contracción muscular o la activación de la transcripción génica<sup>[1]</sup>. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$ ) depende en cada momento de la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que entra en la célula a través de transportadores del plasmalema y de la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  retirado por los mecanismos de extrusión de que dispone la célula, bien desde los depósitos intracelulares o al exterior celular<sup>[2]</sup>. Así, la señal intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es un estímulo esencial para las células, por lo que ha de estar finamente regulado para no provocar efectos indeseados. Para ello, la célula dispone de una compleja maquinaria que mantiene la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en niveles fisiológicos.

Las vías de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol celular pueden ser a través de la membrana plasmática o bien desde depósitos intracelulares. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  entran en el citosol por medio de canales iónicos permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  y receptores acoplados a canales iónicos, como el receptor de glutamato sensible a *N*-metil-*D*-aspartato (r-NMDA), el receptor nicotínico de acetilcolina (r-nACh), receptor de glutamato sensible a ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (r-AMPA) o el receptor de glutamato sensible al ácido kaínico (**figura 1**). Estos canales permiten que el  $\text{Ca}^{2+}$  fluya a favor de gradiente

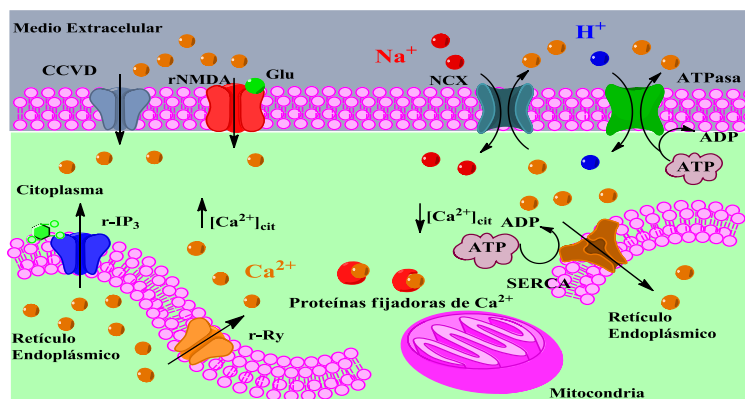
---

<sup>1</sup> Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4:7:517-529.

<sup>2</sup> Berridge, M.J. (1997) Elementary and global aspects of calcium signaling. *J. Exp. Biol.* 200:2:315-319.

al interior de la célula desde el medio extracelular. Además, otros canales permiten que el  $\text{Ca}^{2+}$  sea liberado desde el interior del retículo endoplásmico (RE) hacia el citosol, (**figura 1**) como el caso de los receptores sensibles al segundo mensajero inositol-1,4,5-trifosfato ( $\text{r-IP}_3$ ) y los receptores de rianodina ( $\text{r-Ry}$ ) que son sensibles a cafeína y al alcaloide rianodina. Ambos tipos de canales son sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ , aumentando la liberación  $\text{Ca}^{2+}$  en su presencia en un mecanismo que se conoce como liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (CICR, por sus siglas en inglés "*Calcium Induced Calcium Release*")<sup>[3]</sup>.

La célula disminuye la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  mediante proteínas citosólicas como calmodulina, calbindina-D28K y parvalbúmina, o proteínas transportadoras localizadas en la membrana plasmática como el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , (NCX, del inglés, "*Sodium Calcium Exchanger*"), intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  y la bomba ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[4]</sup>. En el RE se encuentra la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana del RE (SERCA, del inglés "*Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase*"). Esta bomba transporta  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del retículo con gasto de energía. Una vez en el interior reticular, el  $\text{Ca}^{2+}$  es captado por proteínas fijadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  como calreticulina, calsecuestrina y proteínas de estrés reticular como GRP78 y GRP94<sup>[1]</sup>.



**Figura 1. - Mantenimiento de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  celular.**

<sup>3</sup> Carafoli, E. (2005) Calcium -a universal carrier of biological signal. *FEBS. Journal* **272**:1073-1089.

<sup>4</sup> Guerini, D.; Coletto, L.; Carafoli, E. (2005) Exporting calcium from cells. *Cell Calcium*. **38**:3-4:281-289.

## 1.2. - Mitocondria

La mitocondria es un orgánulo de vital importancia para la supervivencia celular, por su producción de energía para la célula, en forma de trifosfato de adenosina (ATP, de sus siglas en inglés "*Adenosine Triphosphate*"). Posee una doble membrana que a su vez encierra dos espacios diferenciados, la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana mitocondrial. Las dos membranas tienen distinta permeabilidad. La membrana mitocondrial externa es rica en una proteína transportadora llamada porina, que permite el paso de sustancias de hasta 5 KDa, incluyendo pequeñas proteínas<sup>[5]</sup>, mientras que la membrana interna está especializada y es menos permeable; por ella se permite el paso de ciertas sustancias dada la alta especificidad de sus proteínas transportadoras y de las proteínas de la cadena respiratoria. Debido a la presencia de la maquinaria productora de la energía celular, tradicionalmente solo se consideró a la mitocondria la productora de la energía celular, hasta que se demostró que era capaz de captar  $\text{Ca}^{2+}$  y que esta captación era dependiente del transporte electrónico<sup>[6]</sup>.

En la mitocondria, el principal mecanismo de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es por medio del uniportador mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  (MCU, por sus siglas en inglés "*Mitochondrial Calcium Uniporter*") descubierto en mitocondrias aisladas expuestas a una solución de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[7]</sup> e identificado molecularmente en 2011<sup>[8]</sup>. La absorción de  $\text{Ca}^{2+}$  se atribuye a una entrada a favor de gradiente debido al

---

<sup>5</sup> Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2002) Molecular Biology of the Cell 4<sup>a</sup> edition. *Science*. 767-829.

<sup>6</sup> Vasington, F.D. (1963) Calcium ion uptake by fragments of rat liver mitochondria and its dependence on electron transport. *J. Biol. Chem.* **238**:1841-1847.

<sup>7</sup> Carafoli, E. (1979) The calcium cycle of mitochondria. *FEBS. Lett.* **104**:1-5.

<sup>8</sup> a) De Stefani, D.; Raffaello, A.; Teardo, E.; Szabò, I.; Rizzuto, R. (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. **476**:7360:336-340.  
b) Baughman, J.M.; Perocchi, F.; Girgis, H.S.; Plovanich, M.; Belcer-Timme, C.A.; Sancak, Y.; Bao, X.R.; Strittmatter, L.; Goldberger, O.; Bogorad, R.L.; Koteliensky, V.; Mootha, V.K. (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. **476**:7360:341-345.

potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), de -180 mV. El  $\Delta\Psi_m$  se produce por el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana que realiza la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTE)<sup>[9]</sup>.

La captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por medio del MCU puede ser bloqueada mediante el colorante inorgánico Rojo de Rutenio, (RuR, por sus siglas en inglés "*Ruthenium Red*")<sup>[10]</sup>. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del MCU también se frena si el gradiente de  $\Delta\Psi_m$  se disipa por la aplicación de los protonóforos carbonil cianina *m*-clorofenilhidrazona (CCCP) o carbonil cianina *p*-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP)<sup>[11]</sup>.

Por otra parte, la salida del  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol es típicamente dependiente del ión  $\text{Na}^+$ , ya que viene mediada por el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial<sup>[12]</sup> (mNCX, por sus siglas en inglés "*mitochondrial Sodium Calcium Exchanger*"). Además de este intercambiador, la mitocondria también dispone de un intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , el cual es el encargado de mantener la concentración adecuada de  $\text{H}^+$  para el funcionamiento de la CTE. Estos dos intercambiadores, mNCX y  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ <sup>[9]</sup>, colaboran en el aclaramiento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ ), incrementada cuando se activa el MCU. El intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  es electroneutro, puesto que saca un ión  $\text{Ca}^{2+}$  por cada dos  $\text{H}^+$  que introduce a la matriz, por lo que no contribuye al mantenimiento del  $\Delta\Psi_m$ , a diferencia del mNCX<sup>[12]</sup>, que sí es electrogénico, ya

<sup>9</sup> Álvarez, J.; Montero, M.; García-Sancho, J. (1999) Subcellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics. *News Physiol. Sci.* **14**:161-168.

<sup>10</sup> Hajnóczky, G.; Csordás, G.; Das, S.; García-Pérez, C.; Saotome, M.; Sinha-Roy, S.; Yi, M. (2006) Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in apoptosis. *Cell Calcium*. **40**:5-6:553-560.

<sup>11</sup> Babcock, D.F.; Hillet, B. (1998) Mitochondrial oversight of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling *Curr. Op. Neurobiol.* **8**:398-404.

<sup>12</sup> Palty, R.; Silverman, W.F.; Hershfinkel, M.; Caporale, T.; Sensi, S.L.; Parnis, J.; Nolte, C.; Fishman, D.; Shoshan-Barmatz, V.; Herrmann, S.; Khananshvili, D.; Sekler, I. (2010) NCLX is an essential component of mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**:1:436-41.

que introduce 3 iones  $\text{Na}^+$  por cada ión  $\text{Ca}^{2+}$  que saca de la matriz. Algunos autores argumentan que en ciertas condiciones el mNCX puede actuar de manera electroneutra, intercambiando un ión  $\text{Ca}^{2+}$  por cada dos de  $\text{Na}^+$ <sup>[13]</sup>.

En condiciones de estrés mitocondrial la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  del interior mitocondrial acontece por la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP, por sus siglas en inglés "*mitochondrial Permeability Transition Pore*")<sup>[14]</sup>. El mPTP es una proteína que se forma en la membrana interna de las mitocondrias en ciertas condiciones patológicas, tales como una lesión cerebral traumática o un accidente cerebrovascular. La apertura o inducción del mPTP puede conducir a la hinchazón mitocondrial y muerte celular, por apoptosis o necrosis<sup>[15]</sup>.

### 1.2.1. - Compuestos que actúan a nivel mitocondrial

Además de sus conocidas funciones como la fosforilación oxidativa y el metabolismo celular, la mitocondria desempeña un papel central en la muerte celular, procesos neoplásicos, diferenciación celular, en el sistema inmune innato, en la detección de la hipoxia por detección de niveles de  $\text{O}_2^-$  y en la homeostasia del  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[16]</sup>.

La alteración de estos procesos contribuye a una serie de patologías. La disfunción mitocondrial se asocia a menudo con el daño oxidativo, alteraciones en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , defectuosa síntesis de ATP o la inducción de la apertura del mPTP. La disfunción mitocondrial se puede clasificar como

---

<sup>13</sup> Castaldo, P.; Cataldi, M.; Magi, S.; Lariccia, V.; Arcangeli, S.; Amoroso, S. (2009) Role of the mitochondrial sodium/calcium exchanger in neuronal physiology and in the pathogenesis of neurological diseases. *Progress in Neurobiology*. **87**:58-79.

<sup>14</sup> Zoratti, M.; Szabb, I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*. **1241**:139-176.

<sup>15</sup> Lemasters, J.J.; Theruvath, T.P.; Zhong, Z.; Nieminen, A.L. (2009). Mitochondrial calcium and permeability transition in cell death. *Biochim. Biophys. Acta*. **1787**:11:1395-1401.

<sup>16</sup> Wallace, D.C. (2010) Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol.* **5**:297-348.

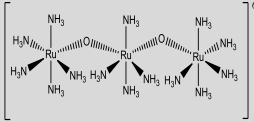
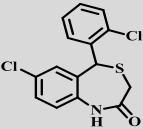
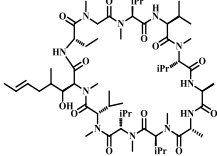
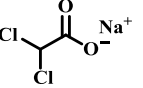
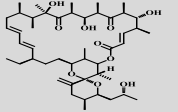
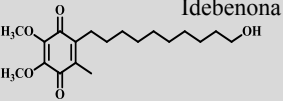
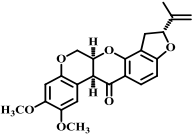
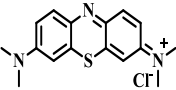
primaria o secundaria<sup>[17]</sup>. La disfunción mitocondrial primaria es la que viene determinada por una mutación en los genes codificados en el ADN mitocondrial (ADN<sub>mit</sub>), por un gen nuclear que codifica una proteína mitocondrial, o bien por una toxina mitocondrial. Por el contrario, la disfunción mitocondrial secundaria es causada por eventos patológicos que se originan fuera de la mitocondria, por ejemplo, lesiones derivadas de isquemia, enfermedades neurodegenerativas, síndrome metabólico, trasplante de órganos, cáncer, enfermedades autoinmunes o diabetes<sup>[16]</sup>.

En consecuencia, las mitocondrias son un nodo importante para la intervención terapéutica, incluso si el daño real del orgánulo no es el evento patológico principal. En base a estas investigaciones tenemos diferentes compuestos que tienen como diana biológica la mitocondria, y con los cuales podemos modular su actividad, algunos de estos compuestos se encuentran reflejados en la **tabla 1**.

---

<sup>17</sup> Smith, R.A.J.; Hartley, R.C.; Cochemé, H.M.; Murphy, M.P. (2012) Mitochondrial pharmacology *Trends. Phar. Sci.* **33**:6:341-352.

Tabla 1. - Herramientas farmacológicas de uso común para modular la función mitocondrial

Compuesto	Diana mitocondrial	Modo de acción	Compuesto	Diana mitocondrial	Modo de acción
 Rojo de rutenio (RuR)	MCU	Bloquea la entrada de $\text{Ca}^{2+}$	 CGP37157	mNCX	Bloquea la salida de $\text{Ca}^{2+}$
 Ciclosporina A (CsA)	mPTP	Inhibe la apertura de mPTP	 Dicloroacetato	Complejo piruvato deshidrogenasa	Activación del complejo piruvato
 Oligomicina A	Complejo V de la CTE	Inhibe la CTE	 Idebenona	Complejo I de la CTE	Antioxidante, inhibe la CTE
 Rotenona	Complejo I de la CTE	Inhibe la CTE	 Azul de Metileno	Complejo IV de la CTE	Activación del complejo IV de la CTE

Algunos de estos compuestos se han usado en clínica como la CsA, que actúa como inmunosupresor, además de inhibidor eficaz de la ciclofilina-D dentro de mitocondrias, impidiendo de este modo la apertura del mPTP<sup>[18]</sup>. La apertura de mPTP en modelos animales con una lesión por isquemia viene producida por un daño oxidativo, bajos niveles de ATP y una dishomeostasia del  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta combinación de efectos conduce a la activación de la ciclofilina-D que es dependiente de la inducción del poro en la membrana interna mitocondrial. Una vez formado el poro, se produce la interrupción de la síntesis de ATP, el hinchamiento mitocondrial y la consiguiente muerte celular necrótica característica de las lesiones isquémicas. En cambio, la ciclofilina-D se inhibe en presencia de CsA previniendo de esta manera la inducción del mPTP.

Un potencial abordaje terapéutico para evitar la disfunción mitocondrial sería regulando los daños en la CTE, por ejemplo, debidas a un defecto en el  $\text{ADN}_{\text{mit}}$ . Se podría proporcionar una vía para que los electrones pasen por alto ese defecto en la cadena, permitiendo así continuar con el bombeo de  $\text{H}^+$  y la síntesis de ATP. Otro abordaje sería el contrario, realizar una derivación de electrones en un paso de la CTE que funciona normalmente, lo que daría lugar a una síntesis de ATP menos eficiente, y por tanto a una disminución el estrés oxidativo. Un compuesto que ha mostrado ser prometedor en este aspecto es el azul de metileno<sup>[19]</sup>. Este compuesto puede recoger diversos electrones liberados por las NAD(P)H deshidrogenasas y donarlos al citocromo C (Cit.C). Su modo de acción no está claro, pero se ha determinado que puede aumentar la expresión del complejo IV de la CTE como respuesta a una reducida acumulación del Cit.C<sup>[19]</sup>. El posible beneficio terapéutico de compuestos tipo ubiquinonas de cadena corta, tales como la idebenona, análogo sintético de la

---

<sup>18</sup> Rasola, A.; Bernardi, P. (2011) Mitochondrial permeability transition in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*. **50**:222-233.

<sup>19</sup> Atamna, H.; Kumar, R. (2010) Protective role of methylene blue in Alzheimer's disease via mitochondria and cytochrome c oxidase. *J. Alzheimer's. Dis.* **20**:(Suppl.2):S439-S452.



coenzima Q10, se debe a que recogerían los electrones del complejo I dañado y transmitirlos al complejo III<sup>[20,21]</sup>. De esta manera, se consigue que la CTE siga realizando su función aunque alguno de los componentes se encuentre comprometido.

### 1.3. - Enfermedades neurodegenerativas y alteración del $\text{Ca}^{2+}$ celular

Diversas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Huntington (EH) y las ataxias espinocerebelosas (AEC), representan un enorme problema médico, social, económico y científico. A pesar de la intensa investigación sobre las causas de estas enfermedades, estas siguen siendo incurables. Los medicamentos aprobados para su tratamiento resultan un alivio limitado, ya que principalmente palian temporalmente los síntomas relacionados con la enfermedad o retrasan, modestamente, su progresión (**tabla 2**)<sup>[22]</sup>.

Los principales avances en la comprensión de estas enfermedades se han relacionado con la identificación de las mutaciones causantes de la neurodegeneración. Sin embargo, la mayoría de los casos de EA, EP y ELA son de carácter esporádico, con solo un componente genético en el 5% de los casos diagnosticados. La mayoría de los genes responsables de las formas familiares se conocen, lo que ha permitido la formulación de diversas hipótesis sobre su mecanismo patogénico, así como la generación de modelos animales

---

<sup>20</sup> Haefeli, R.H.; Erb, M.; Gemperli, A.C.; Robay, D.; Fruh, I.F.; Anklin, C.; Dallmann, R.; Gueven, N. (2011) NQO1-dependent redox cycling of idebenone: effects on cellular redox potential and energy levels. *PLoS. ONE*. 6:17963.

<sup>21</sup> Fash, D.M.; Khdour, O.M.; Sahdeo, S.J.; Goldschmidt, R.; Jaruvangsanti, J.; Dey, S.; Arce, P.M.; Collin, V.C.; Cortopassi, G.A.; Hecht, S.M. (2013) Effects of alkyl side chain modification of coenzyme Q10 on mitochondrial respiratory chain function and cytoprotection. *Bioorg. Med. Chem.* 21:2346-2354.

<sup>22</sup> Bezprozvanny, I. (2009) Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends. Mol. Med.* 15:89-100.

transgénicos<sup>[22]</sup>. Por ejemplo, para la EA se ha propuesto, entre otras causas, la acumulación del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta\text{A}$ ), en lo que se conoce como placas seniles. Así, la gran parte de la investigación en la EA está dirigida a encontrar maneras de prevenir la acumulación del péptido  $\beta\text{A}$ , bien mediante el bloqueo de su producción o facilitando su aclaración del cerebro. En el caso de EH, la causa principal de la enfermedad es la expresión de la proteína mutante huntingtina ( $Htt^{exp}$ ). El principal esfuerzo en esta patología se ha centrado en reducir la expresión de  $Htt^{exp}$  en el cerebro, por ejemplo mediante el uso de  $\text{ARN}_i$  silenciadores. Para el caso de la EP, su patología se debe a la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra en el sistema nervioso central (SNC). La mayoría de los genes implicados en la EP familiar (por ejemplo, PINK1, DJ-1, LRRK2 y Parkina) codifican proteínas asociadas con ciertos aspectos de la función mitocondrial<sup>[23]</sup>, teniendo un papel crucial en la patogénesis de dicha enfermedad. La ELA es un trastorno que resulta de la degeneración selectiva de las neuronas motoras. La mayoría de los casos de ELA son esporádicos, aunque los casos familiares, poco comunes, son el resultado de mutaciones en la enzima superóxido dismutasa-1 ( $\text{SOD-1}$ )<sup>[24]</sup>. Las mutaciones en  $\text{SOD-1}$  parecen causar la enfermedad, pero no afectando a la actividad de la enzima, sino mediante la inducción de la agregación de la enzima y/o causando una asociación patológica de la  $\text{SOD-1}$  con las mitocondrias<sup>[25]</sup>. Al igual que en la EH, la AEC es un trastorno genético autosómico dominante causado por la expansión de poliglutamina en las

---

<sup>23</sup> Abou-Sleiman, P.M.; Muqit, M.M.; Wood, N.W. (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:207-219.

<sup>24</sup> Gagliardi, S.; Cova, E.; Davin, A.; Guareschi, S.; Abel, K.; Alvisi, E.; Laforenza, U.; Ghidoni, R.; Cashman, J.R.; Ceroni, M.; Cereda, C. (2010)  $\text{SOD1}$  mRNA expression in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* 39:2:198-203.

<sup>25</sup> Monk, P.N.; Shaw, P.J. (2006) ALS: life and death in a bad neighborhood. *Nat. Med.* 12:885-887.

ataxinas<sup>[26]</sup>. Existe cierta evidencia que sugiere que una anormal señalización neuronal del  $\text{Ca}^{2+}$  podría contribuir a esta patología<sup>[27]</sup>.

Varios estudios indican que la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  neuronal es anormal en muchos de estos trastornos. Cambios similares, pero mucho menos severos, en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$ , se producen como resultado del proceso de envejecimiento normal. El papel de dicha señalización neuronal aberrante es el principal foco de investigación en muchas líneas de investigación actuales para poder explicar la patogénesis de los trastornos neurodegenerativos aquí descritos.

---

<sup>26</sup> Gusella, J.F.; MacDonald, M.E. (2000) Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**:109-115.

<sup>27</sup> Watase, K.; Barrett, C.F.; Miyazaki, T.; Ishiguro, T.; Ishikawa, K.; Hu, Y.; Unno, T.; Sun, Y.; Kasai, S.; Watanabe, M.; Gomez, C.M.; Mizusawa, H.; Tsien, R.W.; Zoghbi, H.Y. (2008) Spinocerebellar ataxia type 6 knockin mice develop a progressive neuronal dysfunction with age-dependent accumulation of mutant  $\text{Ca}_v2.1$  channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**:11987-11992.

**Tabla 2. - Enfermedades neurodegenerativas y medicamentos aprobados para su tratamiento.**

Enfermedad	Neuronas afectadas	Edad	Esporádica o familiar	Genes implicados	Fármacos	Mecanismo de acción	Año de aprobación	Efectos
EA	Hipocampales corticales	y > 65	95 % esporádica, 5% familiar	APP	Memantina	Bloquea receptores NMDA, reduce excitotoxicidad	2003	Leve mejoría de sistemas cognitivos
				PSEN1	Donepezilo	Inhibidores de la acetilcolinesterasa.	1996	Leve mejoría de sistemas cognitivos
				PSEN2	Galantamina	Incrementar la concentración de ACh en el cerebro	2001	
					Rivastigmina		2000	
EP	Neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra	> 65	95 % esporádica, 5% familiar	Sinucleína	L-Dopa	Aumenta la cantidad de dopamina en neuronas de la sustancia negra	1970	Beneficio sintomático
				LRRK2				
				Parkina	Seleginina	Inhibidor de MAO-B	2006	
				PINK1 DJ-1	Amantadina	Liberadores presinápticos de dopamina	1976	
ELA	Neuronas motoras	40 – 60	95 % esporádica, 5% familiar	SOD-1	Riluzol	Acción antiglutamatérgica (activador de la captación de glutamato, inhibidor de receptores de NMDA y canales de Na <sup>+</sup> )	1995	Aumenta la supervivencia unos meses
EH	Neuronas del estriado espinoso medio	40 – 50	100 % familiar	Huntingtina	Tetrabenazina	Acción Antidopaminérgica (inhibidor de VMAT2, reduce la cantidad de dopamina)	2008	Reducción de la corea
AEC	Varias regiones del cerebro involucrado en el control motor	40 – 50	100 % familiar	Ataxinas	Enfermedad huérfana de fármacos	---	---	---

### 1.3.1. - $\text{Ca}^{2+}$ y Enfermedad de Alzheimer

La EA se caracteriza clínicamente por el progresivo deterioro de la función cognitiva superior, una pérdida de memoria y la alteración del comportamiento. Las características fisiopatológicas de la enfermedad se aprecian al realizar la autopsia del paciente; la presencia de placas seniles por la formación de agregados principalmente formados por el péptido  $\beta\text{A}$ , de ovillos neurofibrilares intracelulares formados fundamentalmente por la agregación de la proteína  $\tau$  hiperfosforilada, y la contracción de la corteza cerebral debido a la extensa pérdida neuronal<sup>[28]</sup>. Las causas de la EA son ampliamente desconocidas, pero la mayoría de la comunidad científica ha aceptado que el péptido  $\beta\text{A}$ , particularmente el fragmento fibrilogénico 1-42 y sus diversos ensamblajes, juegan un papel fundamental en la EA familiar, en la EA de inicio precoz y esporádica, y en la EA de aparición tardía<sup>[29]</sup>. Los análisis de tejido cerebral de pacientes con la EA revelan que alteraciones de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  celular contribuyen al proceso neurodegenerativo. Por ejemplo, las cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  libre y unido a proteína y la actividad de las proteasas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes se incrementan en neuronas que contienen ovillos neurofibrilares, en comparación con las neuronas sin ellos<sup>[30]</sup>. Diversos estudios demuestran que el péptido  $\beta\text{A}$  altera la homeostasis neuronal de  $\text{Ca}^{2+}$ , mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés "*Reactive Oxygen Species*"), como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), en un proceso catalizado por iones  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Fe}^{2+}$ <sup>[31]</sup>. El péptido  $\beta\text{A}$  se acumula en

---

<sup>28</sup> Giannakopoulos, P.; Kovari, E.; Gold, G.; Von Gunten, A.; Hof, P.R.; Bouras, C. (2009) Pathological substrates of cognitive decline in Alzheimer's disease, *Front. Neurol. Neurosci.* **24**:20-29.

<sup>29</sup> Hardy, J.; Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science*. **297**:353-356.

<sup>30</sup> Murray, F.E.; Landsberg, J.P.; Williams, R.J.; Esiri, M.M.; Watt, F. (1992) Elemental analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease using protoninduced X-ray analysis. *Ciba. Found. Symp.* **169**:201-210.

<sup>31</sup> Hensley, K.; Carney, J.M.; Mattson, M.P.; Aksenova, M.; Harris, M.; Wu, J.F.; Floyd, R.; Butterfield, D.A. (1994) A model for  $\beta$ -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free

las membranas celulares y las ROS generadas por los oligómeros de  $\beta\text{A}$  inducen estrés oxidativo asociado a la membrana plasmática, lo que puede perjudicar el funcionamiento de las ATPasas de membrana y de diversas bombas e intercambiadores de iones ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas), al igual que a transportadores de glucosa y de glutamato<sup>[28]</sup>. Las acciones que produce el péptido  $\beta\text{A}$  causan una elevación de los niveles basales de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, sensibilizando a las neuronas frente a la excitotoxicidad y la apoptosis<sup>[32]</sup>. Se ha postulado también que los oligómeros del péptido  $\beta\text{A}$  puede alterar la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante la formación de poros permeables a dicho ión en las membranas celulares<sup>[33]</sup> (**figura 2**).

Toda esta alteración en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  hace que los niveles de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  aumenten, y debido a ello el  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$  es redirigido hacia el RE por medio de la SERCA. Un aumento en el nivel luminal de  $\text{Ca}^{2+}$  produce la sensibilidad de los r-Ry que liberan ese  $\text{Ca}^{2+}$  del RE<sup>[34]</sup>. Otra fuente de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  son los r-IP<sub>3</sub> reticulares que generan una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que rápidamente es captada por la mitocondria por medio del MCU realizando la función de tamponador citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[34,35]</sup>. Durante esta fase, el  $\text{Ca}^{2+}$  "secuestrado" por las mitocondrias es liberado de nuevo al citoplasma por medio del mNCX, volviendo a ser captado por el RE y a su vez por la mitocondria. Este flujo positivo de  $\text{Ca}^{2+}$  distorsiona la circulación normal de este ión. Esta absorción

---

radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **91**:3270-3274.

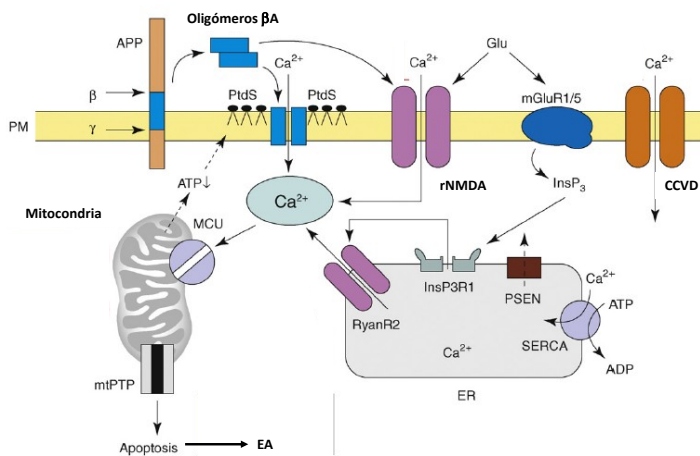
<sup>32</sup> a) Mark, R.J.; Hensley, K.; Butterfield, D.A.; Mattson, M.P. (1995) Amyloid  $\beta$ -peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and cell death. *J. Neurosci.* **15**:6239-6249. b) Mark, R.J.; Keller, J.N.; Kruman, I.; Mattson, M.P. (1997) Basic FGF attenuates amyloid  $\beta$ -peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in hippocampal neurons. *Brain Res.* **756**:205-214.

<sup>33</sup> Kawahara, M.; Kuroda, Y. (2000) Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's  $\beta$ -amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res. Bull.* **53**:389-397.

<sup>34</sup> Berridge, M.J. (2010) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers. Arch-Eur. J. Physiol.* **459**:441-449.

<sup>35</sup> Rizzuto, R.; Brini, M.; Murgia, M.; Pozzan, T. (1993) Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*. **262**:5134:744-747.

excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  por medio del MCU provoca el colapso del  $\Delta\Psi_m$ , facilita la apertura del mPTP y la consecuente liberación de Cit.C, que activa la cascada de las caspasas responsable de la apoptosis celular. También, una acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial hace que se produzca un aumento de las ROS, una síntesis deficiente de ATP, favoreciendo así la apertura del mPTP<sup>[36]</sup>.



**Figura 2. - Modelo de la alteración de la homeostasia de  $\text{Ca}^{2+}$  en EA.** Las divisiones secuenciales de la proteína precursora de β-amiloide (APP) por β-secretasa (β) y γ-secretasa (γ) generan el péptido βA. El βA forma oligómeros que pueden insertarse en

la membrana plasmática y formar poros permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ . La asociación de oligómeros de βA con la membrana plasmática se ve facilitada por la unión a la superficie con la fosfatidilserina (PTD). La reducción en los niveles de ATP y la pérdida de integridad de la membrana provoca la despolarización de la membrana, lo que conduce a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de r-NMDA y CCVD. Los oligómeros de βA también pueden afectar a la actividad del r-NMDA y CCVD directamente. El glutamato estimula la activación de los r-mGluR1/5 liberando  $\text{IP}_3$  el cual libera  $\text{Ca}^{2+}$  del RE al citosol, generando una señal de  $\text{Ca}^{2+}$  que rápidamente es captada por la mitocondria por medio del MCU, con la consiguiente apertura del mPTP y produciendo la muerte celular por apoptosis. Figura adaptada<sup>[22]</sup>.

<sup>36</sup> Berridge, M.J. (2011) Calcium Signalling and Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* **36**:1149-1156.

### 1.3.2. - $\text{Ca}^{2+}$ y Enfermedad de Parkinson

La idea predominante en la EP es la hipótesis dopaminérgica, que establece que la dopamina (DA) actúa como un estímulo tóxico natural y su oxidación citosólica a 6-hidroxidopamina (6-HDA) y otros metabolitos daña las mitocondrias, causando la muerte celular de las neuronas del SNC<sup>[37]</sup>.

La  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin) es un componente importante de los cuerpos de Lewy que se ha observado en cerebros de pacientes con la EP. El mecanismo probable de toxicidad de la  $\alpha$ -sin está relacionada con la formación de pequeños agregados (protofibrillas), las cuales pueden generar poros iónicos en las membranas lipídicas<sup>[38]</sup> e inducir la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a las neuronas<sup>[39,40]</sup>. El mecanismo propuesto de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los poros de agregados de  $\alpha$ -sin es similar a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  formados por los oligómeros de  $\beta\text{A}$  en la EA (**figura 3**).

La "hipótesis del  $\text{Ca}^{2+}$ " en la EP<sup>[41]</sup> se ve corroborada por estudios fisiológicos. Las neuronas dopaminérgicas utilizan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ( $\text{Ca}_v1.3$ ) para producir sus potenciales de acción. La continua entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , bien por los CCVD, bien por los poros de  $\alpha$ -sin, crea un exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol que hace a estas neuronas particularmente vulnerables hacia esta alteración en la homeostasia del  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[42]</sup>. Esta alteración en la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  es

---

<sup>37</sup> Sulzer, D. (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends. Neurosci.* **30**:244-250.

<sup>38</sup> Volles, M.J. (2001) Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry.* **40**:7812-7819.

<sup>39</sup> Danzer, K.M. (2007) Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J. Neurosci.* **27**:9220-9232.

<sup>40</sup> Furukawa, K. (2006) Plasma membrane ion permeability induced by mutant alpha-synuclein contributes to the degeneration of neural cells. *J. Neurochem.* **97**:1071-1077.

<sup>41</sup> Surmeier, D.J. (2007) Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet. Neurol.* **6**:933-938.

<sup>42</sup> Chan, C.S. (2007) 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature.* **447**:1081-1086.



rápidamente tamponada por la mitocondria, produciendo una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior mitocondrial que lleva a un estrés oxidativo, la apertura del mPTP y la muerte celular apoptótica. Además, las mitocondrias se encuentran comprometidas debido al daño que producen sobre ellas los productos de oxidación de la DA y sus metabolitos.

En la EP familiar, varios genes relacionados con las mitocondrias se encuentran afectados, como PINK1, DJ-1 y Parkina. Aunque su función no se conoce completamente, PINK1 es importante para el metabolismo de los radicales libres en la mitocondria, la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , y el mantenimiento del ADN<sub>mit</sub><sup>[43]</sup>. En fibroblastos de pacientes con EP que presentan mutaciones en PINK1 y en modelos de ratón "knock-out" para dicho gen, se ha visto una defectuosa fosforilación oxidativa, aumento de los radicales libres y una reducción en el número de mitocondrias<sup>[44]</sup>.

Las mutaciones de DJ-1 son una causa rara en la EP familiar. Se cree que DJ-1 le confiere a la célula protección frente al estrés oxidativo mediante la reducción del plegamiento y/o la agregación de proteínas anómalas que podrían derivar en estrés oxidativo; en ratones "knock-out" para DJ-1 se observaron bajos niveles de proteínas mitocondriales, alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y aumento del daño oxidativo<sup>[45]</sup>, también se ha visto que DJ-1 puede ayudar a reducir la agregación de  $\alpha$ -sin<sup>[46]</sup>.

---

<sup>43</sup> Gandhi, S.; Wood-Kaczmar, A.; Yao, Z.; Plun-Favreau, H.; Deas, E.; Klupsch, K.; Downward, J.; Latchman, D.S.; Tabrizi, S.J.; Wood, N.W.; Duchon, M.R.; Abramov, A.Y. (2009) PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol. Cell.* **33**:627-638.

<sup>44</sup> Grünewald, A.; Gegg, M.E.; Taanman, J.W.; King, R.H.; Kock, N.; Klein, C.; Schapira, A.H.V. (2009) Differential effects of PINK1 nonsense and missense mutations on mitochondrial function and morphology. *Exp. Neurol.* **219**:266-273.

<sup>45</sup> Guzmán, J.N.; Sánchez-Padilla, J.; Wokosin, D.; Kondapalli, J.; Ilijic, E.; Schumacker, P.T.; Surmeier, D.J. (2010) Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature.* **468**:696-700.

<sup>46</sup> Batelli, S.; Albani, D.; Rametta, R.; Polito, L.; Prato, F.; Pesaresi, M.; Negro, A.; Forloni, G. (2008) DJ-1 modulates alpha-synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress: relevance for Parkinson's disease and involvement of HSP70. *PLoS. One.* **3**:e1884.

Aparte de las causas genéticas en la EP que influyen sobre proteínas mitocondriales afectando a su función, se ha identificado  $\alpha$ -sin (aunque se haya predominantemente en el citosol) en las mitocondrias<sup>[47]</sup>, observándose que puede mediar con las membranas mitocondriales, influyendo en la sinapsis neuronal e inhibiendo el complejo I mitocondrial<sup>[48]</sup>.

Otros factores exógenos y ambientales (drogas de abuso e insecticidas) pueden afectar a la función mitocondrial y producir EP. Por ejemplo, el compuesto 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), un producto secundario que se forma en la síntesis de meperidina o heroína sintética, se convierte en 1-metil-4-fenilpiridinio ( $\text{MPP}^+$ ) por acción de la enzima monoamino oxidasa B (MAO-B).  $\text{MPP}^+$  entra en las neuronas e inhibe potentemente el complejo I mitocondrial, causando la muerte de las neuronas<sup>[49]</sup>. La intoxicación por determinados pesticidas y herbicidas, como el dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo (paraquat) en ratones, ha permitido reproducir mecanismos degenerativos muy parecidos a la EP<sup>[50]</sup>.

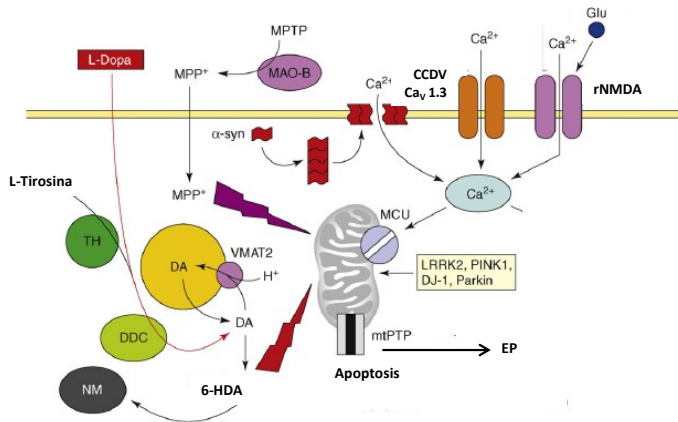
---

<sup>47</sup> Li, W.W.; Yang, R.; Guo, J.C. (2007) Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport*. **8**:1543-1546.

<sup>48</sup> Liu, G.; Zhang, C.; Yin, J. (2009) alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci. Lett.* **454**:187-192.

<sup>49</sup> Bajpai, P.; Sangar, M.C.; Singh, S.; Tang, W.; Bansal, S.; Chowdhury, G.; Cheng, Q.; Fang, J.K.; Martin, M.V.; Guengerich, F.P.; Avadhani, N.G. (2013) Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by mitochondrion-targeted cytochrome P450 2D6: implications in Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* **288**:6:4436-4451.

<sup>50</sup> Ossowska, K.; Smialowska, M.; Kuter, K.; Wieronska, J.; Zieba, B.; Wardas, J.; Nowak, P.; Dabrowska, J.; Bortel, A.; Biedka, I.; Schulze, G.; and Rommelspacher, H. (2006) Degeneration of dopaminergic mesocortical neurons and activation of compensatory processes induced by a long-term paraquat administration in rats: Implications for Parkinson's disease. *Neuroscience*. **141**:4:2155-2165.



**Figura 3. - Modelo de desregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la EP.** La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas dopaminérgicas está mediada por los CCVD del tipo L ( $\text{Ca}_v1.3$ ). A su vez, es posible un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  debido al glutamato mediado por r-NMDA. La  $\alpha$ -sin

forma agregados (protofibrillas) que pueden formar canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática. La elevada  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  es tamponada por medio de la mitocondria a través del MCU. La DA se genera a partir de L-tirosina, por acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y se introduce en las vesículas sinápticas por medio de la actividad del cotransportador  $\text{DA}/\text{H}^+$  (VMAT2). La DA que no es introducida en las vesículas se oxida en el citosol a 6-HDA, que causa daño a las proteínas y las mitocondrias por estrés oxidativo. El daño acumulativo a la mitocondria como resultado de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y el estrés oxidativo mediado por los productos de la DA terminan produciendo la apertura del mPTP y la muerte celular apoptótica de neuronas. Figura adaptada<sup>[22]</sup>.

### 1.3.3. - $\text{Ca}^{2+}$ y Esclerosis Lateral Amiotrófica

Como hemos dicho en la introducción de este apartado, las mutaciones en la enzima SOD-1 se dan en los casos de ELA familiar. La SOD-1 mutada es una enzima con ganancia de función, lo que origina un aumento de las ROS mitocondriales, más estrés oxidativo y, por consiguiente, la muerte de neuronas vulnerables<sup>[51]</sup>. La hipótesis emergente sugiere que la degeneración de las motoneuronas en la ELA es causada por la activación neuroinflamatoria de la microglía, que ataca a las neuronas motoras y a los astrocitos. La liberación proinflamatoria de la microglía activa agentes tales como el factor de necrosis tumoral ( $\text{TNF-}\alpha$ ), NO y  $\text{O}_2^-$ , los cuales causan el daño celular en los astrocitos.

<sup>51</sup> Cleveland, D.W.; Rothstein, J.D. (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2:806-819.

La activación de la microglía también produce la liberación masiva de glutamato. El mediador predominante de lesión neuronal es la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de r-NMDA, r-AMPA, canales permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  y CCVD<sup>[52]</sup>, debido a que se han encontrado niveles elevados de glutamato en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes de ELA<sup>[53,54]</sup>, aunque recientemente se ha demostrado que estos niveles elevados de glutamato podrían no deberse a la activación de la microglía<sup>[55]</sup>. El papel de la excitotoxicidad y de la anormal señalización neuronal del  $\text{Ca}^{2+}$  contribuyen de manera importante a la patología de la ELA. Además, se ha observado una acumulación excesiva de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias de las terminaciones nerviosas motoras de pacientes con ELA esporádica<sup>[56]</sup>. Es la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel citosólico la que produce una disfunción mitocondrial, por el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ , conduciendo a una mayor producción de ROS, síntesis deficiente de ATP y la activación de la apertura del mPTP<sup>[56]</sup>. Aparte de la muerte celular producida por la excitotoxicidad glutamatérgica, las mitocondrias presentan disfuncionalidad debido a la enzima SOD-1 mutada. Esto es debido a que SOD-1 no sólo se localiza en las mitocondrias, sino que también interfiere con su función<sup>[57]</sup>. Se

---

<sup>52</sup> a) Choi, D.W.; (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity, *J. Neurosci.* **7**:369-379. b) Van Den Bosch, L.; Vandenbergh, W.; Klaassen, H.; Van Houtte, E.; Robberecht, W. (2000)  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons, *J. Neurol. Sci.* **180**:29-34.

<sup>53</sup> Van Den Bosch, L.; Van Damme, P.; Bogaert, E.; Robberecht, W. (2006) The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1762**:1068-1082.

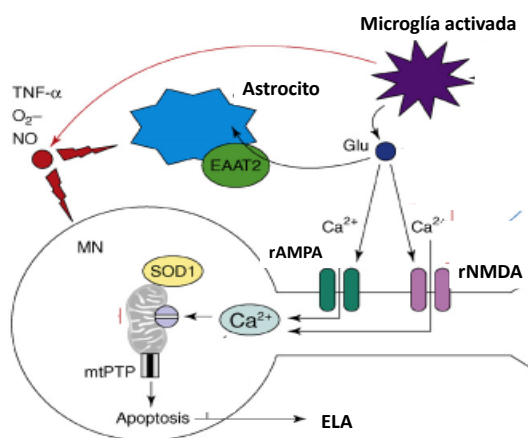
<sup>54</sup> Appel, S.H. (2001) Calcium: the Darth Vader of ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **2**:(Suppl. 1), S47-S54.

<sup>55</sup> Yáñez, M.; Galán, L.; Matías-Guiu, J.; Vela, A.; Guerrero, A.; García, A.G. (2011) CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients produces glutamate independent death of rat motor brain cortical neurons: Protection by resveratrol but not riluzole. *Brain Research.* **1423**:77-86.

<sup>56</sup> a) Carriedo, S.G.; Sensi, S.L.; Yin, H.Z.; Weiss, J.H. (2000) AMPA exposures induce mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J. Neurosci.* **20**:240-250. b) Urushitani, M.; Nakamizo, T.; Inoue, R.; Sawada, H.; Kihara, T.; Honda, K.; Akaike, A.; Shimohama, S. (2001) N-methyl-D-aspartate receptor mediated mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload in acute excitotoxic motoneuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after  $\text{Ca}^{2+}$  influx, *J. Neurosci. Res.* **63**:377-387.

<sup>57</sup> Jaarsma, D.; Rognoni, F.; Van Duijn, W.; Verspaget, H.W.; Haasdijk, E.D.; Holstege, J.C. (2001) CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic

ha demostrado, que la actividad de varios complejos de la CTE mitocondrial y la síntesis de ATP se ve disminuida en presencia de la SOD-1 mutada<sup>[58]</sup>. La disfunción mitocondrial causada por la presencia de SOD-1 puede tener muchas consecuencias. En primer lugar, es posible que la localización de la SOD-1 mutante en las mitocondrias en sí es patógena, independiente de la excitotoxicidad. Se ha demostrado que la presencia de la enzima en la mitocondria activa la liberación de Cit.C, seguida por la activación de la cascada de caspasas<sup>[59]</sup>. En segundo lugar, la disfunción mitocondrial hace que sea difícil para la neurona afectada satisfacer las demandas de sus muchos procesos dependientes de ATP. Además, la disfunción mitocondrial puede alterar la capacidad tamponadora del  $\text{Ca}^{2+}$  por este orgánulo, por lo que se produciría un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  que activaría las rutas de las enzimas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  que llevan a la muerte celular<sup>[60]</sup>.



**Figura 4. - Modelo de excitotoxicidad y desregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en ELA.** La cascada patológica en ELA implica la interacción entre la microglía activada, astrocitos y las neuronas motoras. La activación de la microglía libera factores proinflamatorios,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{NO}$  y  $\text{O}_2^-$ . La activación de la microglía también libera grandes cantidades de glutamato, lo que provoca la

mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol.* **102**:293-305.

<sup>58</sup> Jung, C.; Higgins, C.M.; Xu, Z. (2002) Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurochem.* **83**:535-545.

<sup>59</sup> Takeuchi, H.; Kobayashi, Y.; Ishigaki, S.; Doyu, M.; Sobue, G. (2002) Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **277**:50966-50972.

<sup>60</sup> Damiano, M.; Starkov, A.A.; Petri, S.; Kipiani, K.; Kiaei, M.; Mattiazzi, M.; Flint-Beal, M.; Manfredi, G. (2006) Neural mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J. Neurochem.* **96**:1349-1361.

activación de r-AMPA y r-NMDA en las neuronas. Los astrocitos expresan el transportador de glutamato (EAAT2) que está implicado en la retirada del glutamato desde el espacio extracelular. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  por r-AMPA y r-NMDA da como resultado un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ , por lo que se produce la apertura del mPTP con la consiguiente apoptosis de las neuronas. La enzima SOD-1 mutante se une a las mitocondrias perjudicando su capacidad para regular la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Figura adaptada<sup>[22]</sup>.

#### 1.3.4. - $\text{Ca}^{2+}$ y Enfermedad de Huntington

Los trastornos ya discutidos (EA, EP y ELA) son sobre todo esporádicos con raras formas familiares (**tabla 2**). En contraste, la EH es un trastorno puramente genético derivado de la repetición del codón CAG dando lugar a la expresión de poliglutamina en la proteína huntingtina (*Htt*)<sup>[24]</sup>. Las neuronas más afectadas en la EH son las neuronas estriadas espinosas. La mayoría de los investigadores coinciden en que la proteína *Htt<sup>exp</sup>* adquiere una función tóxica para las neuronas involucradas<sup>[61]</sup>. Hay varios puntos de interferencia de la proteína *Htt<sup>exp</sup>* en las neuronas y la consiguiente alteración del  $\text{Ca}^{2+}$  (**figura 5**). La proteína *Htt<sup>exp</sup>* se une directa y específicamente a la región C-terminal del r- $\text{IP}_3$  del RE<sup>[62]</sup>. La unión de *Htt<sup>exp</sup>* aumenta la sensibilidad del r- $\text{IP}_3$  por el propio  $\text{IP}_3$ <sup>[63]</sup>, esta unión conlleva una salida masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE. La expresión de *Htt<sup>exp</sup>* también afecta a la actividad de r-NMDA que contienen la subunidad NR2B. Un aumento en las corrientes en los r-NMDA debido a los efectos de la *Htt<sup>exp</sup>* produce una sensibilidad a la excitotoxicidad en la membrana plasmática.

Además de afectar a los r- $\text{IP}_3$  y r-NMDA, la *Htt<sup>exp</sup>* también podría afectar la función de los CCVD. La *Htt<sup>exp</sup>* se une directamente a subunidad  $\alpha_2\delta$  de los

<sup>61</sup> Li, S.; Li, X.J. (2006) Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington disease. *Mol. Neurodegener.* **1**:19.

<sup>62</sup> Tang, T.S. (2003) Huntingtin and huntingtin-associated protein-1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5)triphosphate receptor type 1. *Neuron.* **39**:227-239.

<sup>63</sup> Zeron, M.M. (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron.* **33**:849-860.

CCVD<sup>[64]</sup>, ayudando a la formación de poros en los canales tipo N (Ca<sub>v</sub>2.2)<sup>[65]</sup>. Al igual que ocurre en otros trastornos neurodegenerativos, el mecanismo de toxicidad por Ca<sup>2+</sup> en la EH promueve la excesiva acumulación de Ca<sup>2+</sup> en la mitocondria, lo que produce una susceptibilidad a la apertura del mPTP, una deficiente respiración mitocondrial y una baja síntesis del ATP<sup>[66]</sup>. Además de los efectos sobre las mitocondrias, debido a un excesivo transiente de Ca<sup>2+</sup> citosólico, la proteína *Htt<sup>exp</sup>* podría afectar a las mitocondrias directamente mediante la unión a la membrana externa mitocondrial<sup>[67]</sup>. Se ha demostrado que la proteína *Htt<sup>exp</sup>* en asociación con la membrana mitocondrial puede reducir el movimiento axonal de las mismas y reducir la concentración de ATP en la sinapsis.

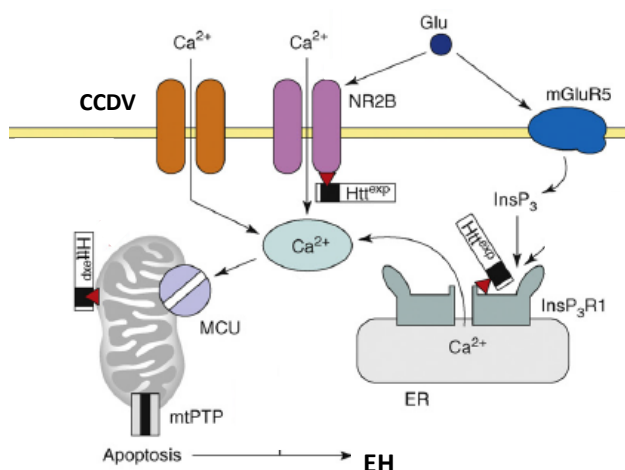
---

<sup>64</sup> Kaltenbach, L.S.; Romero, E.; Becklin, R.R.; Chettier, R.; Bell, R.; Phansalkar, A.; Strand, A.; Torcassi, C.; Savage, J.; Hurlburt, A.; Cha, G.H.; Ukani, L.; Chepanoske, C.L.; Zhen, Y.; Sahasrabudhe, S.; Olson, J.; Kurschner, C.; Ellerby, L.M.; Peltier, J.M.; Botas, J.; Hughes, R.E. (2007) Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet.* **3**, e82.

<sup>65</sup> Swayne, L.A.; Chen, L.; Hameed, S.; Barr, W.; Charlesworth, E.; Colicos, M.A.; Zamponi, G.W.; Braun, J.E.A. (2005) Crosstalk between huntingtin and syntaxin-1A regulates N-type calcium channels. *Mol. Cell. Neurosci.* **30**:339-351.

<sup>66</sup> Lim, D.; Fedrizzi, L.; Tartari, M.; Zuccato, C.; Cattaneo, E.; Brini, M.; Carafoli, E. (2008) Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease. *J. Biol. Chem.* **283**:5780-5789.

<sup>67</sup> a) Orr, A.L.; Li, S.; Wang, C.E.; Li, H.; Wang, J.; Rong, J.; Xu, X.; Mastroberardino, P.G.; Greenamyre, J.T.; Li, X.J. (2008) N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J. Neurosci.* **28**:2783-2792. b) Panov, A.V.; Gutekunst, C.A.; Leavitt, B.R.; Hayden, M.R.; Burke, J.R.; Strittmatter, W.J.; Greenamyre, J.T. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* **5**:731-736.



**Figura 5. - Modelo de disregulación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la EH.** En las neuronas estriadas espinales, la proteína mutada *Htt<sup>exp</sup>* altera la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de varios mecanismos sinérgicos. La proteína *Htt<sup>exp</sup>* mejora los r-NMDA, probablemente mediante la facilitación del tráfico de la membrana plasmática por

unión a la subunidad NR2B de los r-NMDA. A su vez, la *Htt<sup>exp</sup>* se une fuertemente al C-terminal de los r-IP<sub>3</sub> del RE, sensibilizando a IP<sub>3</sub>. También, la activación por medio de glutamato induce la generación de IP<sub>3</sub> y la activación de los r-NMDA, con la consiguiente elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Además, los CCVD generan un flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  adicional. Todas estas señales anómalas de  $\text{Ca}^{2+}$  producen su captación por parte de la mitocondria por medio del MCU, que finalmente provoca la apertura mPTP y la apoptosis celular. La unión de la *Htt<sup>exp</sup>* a la membrana externa mitocondrial puede desestabilizar de manera más directa a dicha organela. Figura adaptada<sup>[22]</sup>.

### 1.3.5. - $\text{Ca}^{2+}$ y Ataxias Espinocerebelosas

En la AEC, la degeneración de las células de Purkinje del cerebelo es debida a la expansión en la proteína nuclear ataxina de la poliglutamina. En función de la ataxina nuclear o citosólica que se encuentre mutada, podremos tener diferentes anomalías en la señalización del  $\text{Ca}^{2+}$ , como una reducción de las proteínas de unión del  $\text{Ca}^{2+}$  (CaBP) en la AEC tipo I, una alteración de los CCVD tipo P/Q en la AEC tipo II, etc. Se ha demostrado que la presencia de ataxina-2 en el RE contribuye a las cascadas de señalización celular mediadas por  $\text{Ca}^{2+}$ . La ataxina-2 mutada interactúa con la región del C-terminal del r-IP<sub>3</sub>,



afectando a la vía de señalización intracelular, pudiendo producir procesos apoptóticos en la célula<sup>[68]</sup>.

En este tipo de trastorno, la función mitocondrial está también comprometida. Las proteínas de poliglutamina pueden inducir apoptosis mediante la activación de la ruta de las caspasas, o por no inhibir a otras proteínas que activan dichas caspasas<sup>[69]</sup>. Se han observado asociaciones entre las caspasas y la ataxina-3, y dicha asociación produce la liberación del Cit.C de la mitocondria<sup>[70]</sup>. Esta liberación de proteínas proapoptóticas mitocondriales puede venir producida por alteraciones en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$ , dado que la poliglutamina mutante aumenta la susceptibilidad de las mitocondrias hacia la captación de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[70]</sup>, con el consiguiente aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$  y la apertura del mPTP.

Como se puede observar en estos cinco trastornos neurodegenerativos, a parte de los múltiples factores patogénicos, existen denominadores comunes. Por ejemplo, la homeostasis celular del  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra alterada, además de un deterioro de la bioenergética mitocondrial. La mitocondria desempeña una función vital para la regulación de la supervivencia o la muerte neuronal. De hecho, muchas de las proteínas específicamente implicadas en las formas genéticas de estas patologías se localizan en la mitocondria o en vías de señalización relacionadas con la muerte neuronal y la autofagia mitocondrial. No es extraño, pues, que las disfunciones mitocondriales sean una característica que comparten las enfermedades neurodegenerativas. Así, por tanto, la estrategia terapéutica enfocada en la modulación de la señal celular de  $\text{Ca}^{2+}$  en el SNC merece atención especial por su potencial capacidad de influir en la

---

<sup>68</sup> Huynh, D.P.; Figueroa, K.; Hoang, N.; Pulst, S.M. (2000) Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat. Genet.* **26**:44-50.

<sup>69</sup> Magaña, J.J.; Velázquez-Pérez, L.; Cisneros, B. (2013) Spinocerebellar Ataxia Type 2: Clinical Presentation, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Perspectives. *Mol. Neurobiol.* **47**:90-104.

<sup>70</sup> Underwood, B.R.; Rubinsztein, D.C. (2008) Spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions: a review of therapeutic strategies. *Cerebellum*. **7**:215-221.

progresión de la neurodegeneración asociada a estas enfermedades, enlenteciendo su evolución.

#### 1.4. - Fármacos moduladores de la señal celular del $\text{Ca}^{2+}$

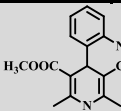
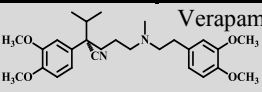
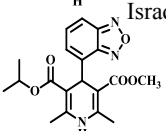
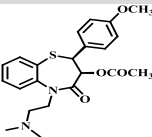
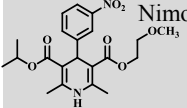
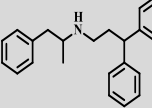
Existen diversas estrategias farmacológicas de modulación de la señal celular de  $\text{Ca}^{2+}$ , que inciden en canales o receptores involucrados. Así, existen fármacos que actúan sobre los CCVD y fármacos que ejercen su efecto sobre el r-NMDA, entre otros.

La mayoría de los ligandos para CCVD son bloqueantes, y se clasifican en cuatro grupos estructurales; a) *1,4-dihidropiridinas*, como *nifedipino*; b) *fenilalquilaminas*, como *verapamilo*; c) *benzotiazepinas*, como *diltiazem*; y d) *difenilmetilalquilaminas*, como *prenilamina*. Los canales  $\text{Ca}_v1$  (tipo L) son las dianas principales de los antagonistas de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , los cuales son ampliamente utilizados en la terapia de enfermedades cardiovasculares<sup>[71]</sup>. La distribución de las tres subfamilias ( $\text{Ca}_v1.1$ - $\text{Ca}_v1.3$ ) de este tipo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  es muy distinta, estando la subfamilia  $\text{Ca}_v1.1$  mayoritariamente en la musculatura lisa vascular, la  $\text{Ca}_v1.2$  en cardiomiocitos, células endocrinas y neuronas, y la subfamilia  $\text{Ca}_v1.3$  se halla mayoritariamente en células endocrinas y neuronas<sup>[71]</sup>. La existencia de dihidropiridinas activadoras de canales confirma que esta familia actúa alostéricamente para cambiar el canal hacia el estado abierto o cerrado en lugar de la oclusión del canal. Las fenilalquilaminas son bloqueantes del poro intracelular, se cree que entran en el poro desde el lado citoplasmático del canal y lo bloquean. En cuanto a las benzotiazepinas, se cree que también tienen un sitio de unión específico, por donde ejercen su efecto modulador<sup>[71]</sup> (**tabla 3**).

---

<sup>71</sup> Catterall, W.A.; Striessnig, J.; Snutch, T.P.; Pérez-Reyes, E. (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Calcium Channels. *Pharmacol. Rev.* **55**:579-581.

**Tabla 3. - Bloqueantes de CCVD**

Compuesto	Grupo estructural	Compuesto	Grupo estructural
 Nifedipino	1,4-dihidropiridina	 Verapamilo	Fenilalquilamina
 Isradipino	1,4-dihidropiridina	 <i>D-cis</i> -Diltiazem	Benzotiazepina
 Nimodipino	1,4-dihidropiridina	 Prenilamina	Difenilmetilalquilamina

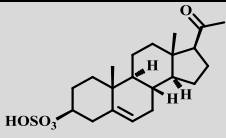
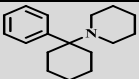
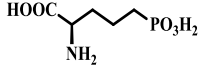
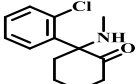
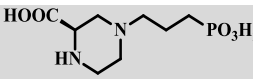
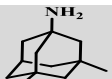
Los r-NMDA han recibido mucha atención en los últimos años debido a su papel clave en la plasticidad y excitotoxicidad neuronal. Muchas de las investigaciones actuales se basan en identificar antagonistas del r-NMDA clínicamente relevantes capaces de bloquear su sobreactivación, sin interferir con la función para la transmisión sináptica normal y la plasticidad neuronal, utilizándose así como fármacos neuroprotectores. Sin embargo, la mayoría de los compuestos ensayados hasta ahora han fracasado en ensayos clínicos<sup>[72]</sup>. La actividad del r-NMDA se puede modular tanto positiva como negativamente. Los moduladores positivos aumentan la respuesta máxima o la afinidad por el glutamato uniéndose en un sitio diferente al del agonista. Algunos compuestos endógenos, tales como poliaminas, pueden potenciar la actividad de los r-GluN2B por el aumento de la sensibilidad de la glicina por el receptor<sup>[73]</sup>. Además, ciertos esteroides pueden modular positivamente la función de los r-NMDA, por ejemplo, el sulfato de pregnenolona potencia la acción de los r-GluN2A o r-GluN2B, aumentando la probabilidad de apertura del canal.

<sup>72</sup> Kalia, L.V.; Kalia, S.K.; Salter, M.W. (2008) NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol.* 7:742-755.

<sup>73</sup> Williams, K.; Dawson, V.L.; Romano, C.; Dichter, M.A.; Molinoff, P.B. (1990) Characterization of polyamines having agonist, antagonist and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. *Neuron.* 5:199-208.

Los antagonistas pueden ser clasificados de acuerdo a su lugar de acción: en el sitio de unión del agonista (competitivo), dentro del poro del canal iónico (bloqueadores de los canales), o en sitios específicos de modulación (no competitivos). Los antagonistas competitivos de los r-NMDA más potentes son el ácido (*R*)-2-amino-5-fosfovalérico y el ácido (*R*)-4-(3-fosfonopropil)-2-piperazinilcarboxílico, los cuales no pueden ser usados como anticonvulsivos en clínica debido a sus múltiples efectos secundarios<sup>[74]</sup>. Antagonistas no competitivos del r-NMDA son la fenciclidina y la ketamina que pueden reducir la degeneración de las neuronas causadas por la isquemia, pero no tienen aplicación terapéutica por su psicotoxicidad<sup>[74]</sup>. La memantina, compuesto capaz de bloquear los r-NMDA de baja afinidad, es el fármaco mejor tolerado clínicamente, probablemente debido a su disociación rápida y a la inactivación del receptor, favoreciendo la mínima interferencia con la transmisión sináptica normal<sup>[75]</sup>.

**Tabla 4. - Antagonistas de los r-NMDA**

Compuesto		Compuesto	
	Sulfato de pregnenolona		Fenciclidina
	Ácido ( <i>R</i> )-2-amino-5-fosfovalérico		Ketamina
	Ácido ( <i>R</i> )-4-(3-fosfonopropil)-2-piperazinilcarboxílico		Memantina

Gracias a las múltiples investigaciones llevadas a cabo, la modulación de la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  se ha convertido en una estrategia terapéutica válida para

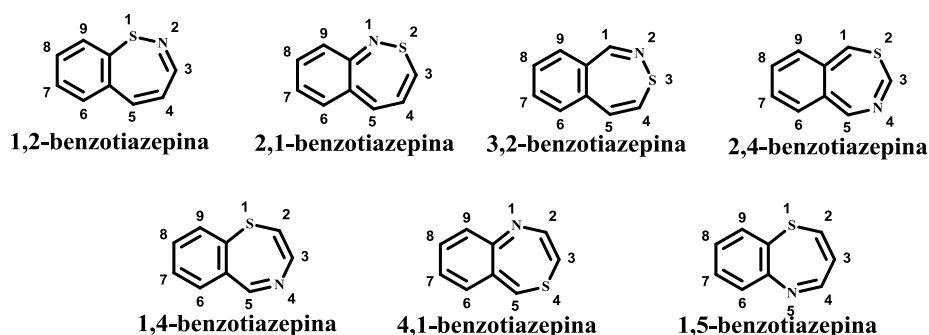
<sup>74</sup> Watkins, J.C.; Evans, R.H. (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **21**:165-204.

<sup>75</sup> Chen, H.S.; Lipton, S.A. (2005) Pharmacological implications of two distinct mechanisms of interaction of memantine with N-methyl-D-aspartate-gated channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**:961-971.

poder mitigar los efectos tóxicos que se producen en las células por la alteración en su homeostasis. Además, las benzotiazepinas han mostrado ser una interesante familia de  $\text{Ca}^{2+}$ -moduladores, de ahí su elección como objeto de estudio en esta memoria.

### 1.5. - Benzotiazepinas

Las benzotiazepinas son compuestos orgánicos formados por la fusión de un anillo de benceno con un anillo heterocíclico de siete miembros, el cual presenta azufre (S) y nitrógeno (N) como heteroátomos. Existen siete posibles benzoderivados según la colocación de los átomos de N y S (**figura 6**)<sup>[76]</sup>,



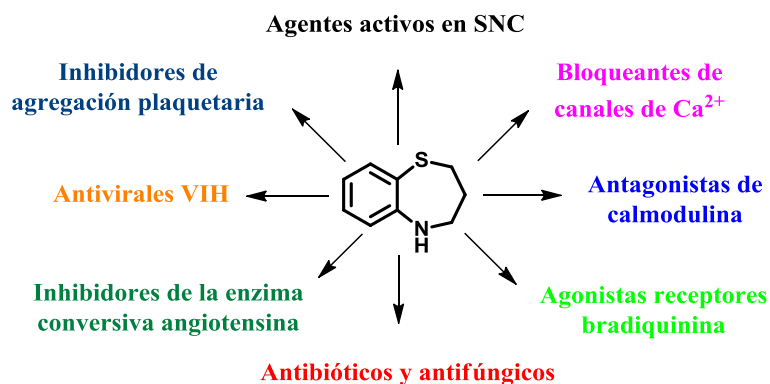
**Figura 6. - Familia de benzotiazepinas.**

Este tipo de compuestos tienen interés terapéutico y farmacológico desde el descubrimiento de la actividad calcio-antagonista del *D-cis*-Diltiazem, una 1,5-benzotiazepina que supuso un avance importante en la terapia cardiovascular<sup>[77]</sup>. Dentro de los siete posibles derivados benzocondensados de esta nueva familia, solamente 4 de ellos (1,2-, 1,4-, 4,1- y 1,5-) presentan actividades farmacológicas relevantes. La familia de derivados de 1,2-benzotiazepina presenta actividad inhibidora del transportador apical de  $\text{Na}^+$  codependiente de ácidos biliares valido para el tratamiento de la

<sup>76</sup> Levai, A. (1995) Synthesis of benzothiazepines. *Trends Heterocycl. Chem.* 4:51-69.

<sup>77</sup> Levai, A. (2000) Synthesis and Chemical Transformation of 1,5-Benzothiazepines. *J. Heterocycl. Chem.* 37:199-214.

hiperlipidemia<sup>[78]</sup>. Las 1,4-benzotiazepinas ejercen actividad antidepresiva, actividad antiarrítmica, inhibición de la absorción de ácidos biliares y reversión de resistencias a múltiples fármacos mediada por la glicoproteína P<sup>[79]</sup>. La familia de derivados 1,5-benzotiazepina es sobre la que mayores estudios se han realizado, ya que se han descrito como moduladores cardiovasculares, vasodilatadores, antiarrítmicos, inhibidores de acetilcolinesterasa, antagonistas de varios receptores acoplados a proteínas G [como el receptor de la colecistoquinina (CCK, por sus siglas en inglés "*Cholecystokinin receptor*")], inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), agentes neoplásicos, efectos hemodinámicos, actividad antiulcerosa o actividad espasmolítica<sup>[80]</sup> (**figura 7**).



**Figura 7. - Versatilidad de la estructura 1,5-benzotiazepina.**

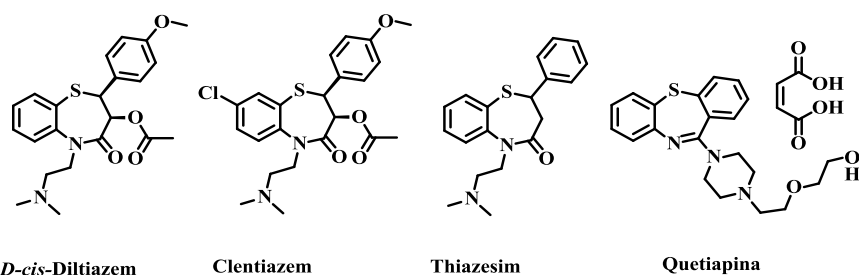
La estructura base de 1,5-benzotiazepina es extremadamente versátil. Sin embargo, sólo cuatro 1,5-benzotiazepinas están en uso, como vasodilatadores

<sup>78</sup> Tollefson, M.B.; Kolodziej, S.A.; Fletcher, T.R.; Vernier, W.F.; Beaudry, J.A.; Keller, B.T.; Reitz, D.B. (2003) A Novel Class of Apical Sodium Co-dependent Bile Acid Transporter Inhibitors: The 1,2-Benzothiazepines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**:3727-3730.

<sup>79</sup> Fodor, L.; Csomós, P.; Holczbauer, T.; Kálmán, A.; Csámpai, A.; Sohár, P. (2011) Expected and unexpected reactions of 1,3-benzothiazine derivatives, I. Ring transformation of  $\beta$ -lactam-condensed 1,3-benzothiazines into 4,5-dihydro-1,4-benzothiazepines and indolo-1,4-benzothiazepines. *Tetrahedron Lett.* **52**:224-227.

<sup>80</sup> Bariwal, J.B.; Upadhyay, K.D.; Manvar, A.T.; Trivedi, J.C.; Singh, J.S.; Jain, K.S.; Shah, A.K. (2008) 1,5-Benzothiazepine, a versatile pharmacophore: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **43**:2279-2290.

coronarios y calcio-antagonistas (*D-cis*-Diltiazem y Clentiazem) y aquellos con actividad antidepresiva (Thiazesim y Quetiapina)<sup>[81]</sup>.



**Figura 8. - Derivados de 1,5-benzotiazepina con uso terapéutico.**

En cuanto a la familia de las **4,1-benzotiazepinas**, objeto de estudio en esta memoria, hay menos literatura científica describiendo sus propiedades farmacológicas, entre las que destacan el bloqueo del mNCX<sup>[82-84]</sup>, inhibición de la enzima escualeno sintasa (enzima que interviene en la transformación del mevalonato en escualeno, para la síntesis del colesterol)<sup>[85,86]</sup> e inhibidores de la proteína farnesiltransferasa<sup>[87]</sup>.

<sup>81</sup> Geyer, H.M.; Watzman, N.; Buckley, J.P. (1970) Effects of a tranquilizer and two antidepressants on learned and unlearned behaviors. *J. Pharm. Sci.* **59**:964-968.

<sup>82</sup> Baron, K.T.; Thayer, S.A. (1997) CGP37157 modulates mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **340**:295-300.

<sup>83</sup> Pei, Y.; Lilly, M. J.; Owen, D. J.; D'Souza, J.O.; Tang, X.Q.; Yu, J.; Nazarbachi, R.; Hunter, A.; Anderson, C.M.; Glasco, S.; Ede, J.N.; James, I.W.; Maitra, U.; Chandrasekaran, S.; Moos, W.H.; Ghosh, S.S. (2003) Efficient Syntheses of Benzothiazepines as Antagonists for the Mitochondrial Sodium-Calcium Exchanger: Potential Therapeutics for Type II Diabetes *J. Org. Chem.* **68**:1:92-103.

<sup>84</sup> Omelchenko, A.; Bouchard, R.; Le, H.D.; Choptiany, P.; Visen, N.; Hnatowich, M.; Hryshko, L.V. (2003) Inhibition of canine (NCX1.1) and Drosophila (CALX1.1) Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers by 7-chloro-3,5-dihydro-5-phenyl-1H-4,1-benzothiazepine-2-one (CGP-37157). *J. Pharm. Exp. Therap.* **306**:1050-1057.

<sup>85</sup> Yang, X.; Buzon, L.; Hamanaka, E.; Liu, K.K.C. (2000) Enzymatic resolution of benzothiazepine for the preparation of squalene synthetase inhibitors. *Tetrahedron: Asymmetry.* **11**:4447-4450.

<sup>86</sup> Miki, T.; Kori, M.; Fujishima, A.; Mabuchi, H.; Tozawa, R.T.; Nakamura, M.; Sugiyama, Y.; Yukimasa, H. (2002) Syntheses of fused heterocyclic compounds and their inhibitory activities for squalene synthase. *Bioorg. Med. Chem.* **10**:2:385-400.

<sup>87</sup> Angibaud, P.; Bourdrez, X.; Devine, A.; End, D. V.; Freyne, E.; Ligny, Y.; Muller, P.; Mannens, G.; Pilatte, I.; Poncelet, V.; Skrzat, S.; Smets, G.; Van Dun, J.; Van Remoortere, P.; Venet, M.; Wouters, W. (2003) 5-Imidazolyl-quinolinones, -quinazolinones and -benzoazepinones as farnesyltransferase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**:9:1543-1547.

### 1.5.1. - Métodos de síntesis

Los métodos de síntesis existentes recogidos en la bibliografía varían según el tipo de compuesto benzocondensado que se quiera sintetizar<sup>[76]</sup>. Las 1,5-benzotiazepinas son las que mayores referencias sintéticas tienen debido a su gran versatilidad farmacológica<sup>[77,88]</sup>. Respecto a las 4,1-benzotiazepinas no existen muchas referencias sintéticas. Pero las nuevas propiedades farmacológicas antes comentadas han hecho surgir nuevos métodos sintéticos. A modo de introducción se comentaran las vías sintéticas existentes para 4,1-benzotiazepinas.

La primera síntesis de 4,1-benzotiazepinas fue propuesta por Uskokovic y colaboradores en 1965<sup>[89]</sup>, haciendo reaccionar 1-bromometil-2-nitrobenzoato con ácido 2-mercaptoacético, para obtener 3,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(1H)-ona en tres pasos sintéticos con muy buenos rendimientos.

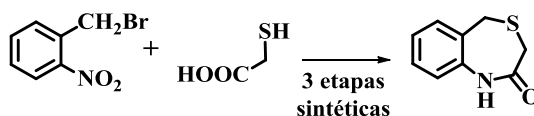


Figura 9. - Síntesis de 4,1-benzotiazepinas según Uskokovic.

Posteriormente, Venugopal y colaboradores<sup>[90]</sup> llevaron a cabo la preparación del primer derivado de benzotiazepina mediante una transposición de Beckmann desde la oxima correspondiente;

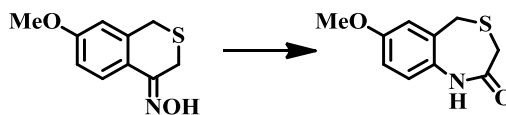


Figura 10. - Síntesis de 4,1-benzotiazepinas por transposición de Beckmann.

<sup>88</sup> Phippen, C, B, W.; McErlean, C, S, P. (2011) A 1,5-benzothiazepine synthesis. *Tetrahedron Letters*. **52**:1490-1492.

<sup>89</sup> Uskokovic, M.; Grethe, G.; Iacobelli, J.; Wenner, W. (1965) The Synthesis of 4,1-Benzothiazepines and 5,1-Benzothiazocines. *J. Org. Chem.* **30**:9:3111-3114.

<sup>90</sup> Venugopal, V.K.; Rao, N.; Rahman, M.F.; Bhalarao, U.T. (1981) *Indian J. Chem.* **20B**:156.



La preparación de derivados sustituidos en la posición 5 se consigue por *S*-alquilación de 2-aminobenzoalcoholes con tioglicolato de metilo seguido de una reacción de ciclación intramolecular<sup>[91]</sup>. Este método sintético se puede llevar a cabo (1) a través de un procedimiento en múltiples etapas<sup>[92]</sup>; (2) a través de un procedimiento de dos etapas con un tiempo de reacción prolongado para completar la *S*-alquilación<sup>[91]</sup>; (3) o a través de un procedimiento de *S*-alquilación mediante el uso de ácido orgánico fuerte como el  $\text{CF}_3\text{COOH}$ <sup>[83]</sup>. El producto de partida no es un reactivo comercial, por lo que se tiene que obtener mediante (1) la reducción de las correspondientes 2-aminobenzofenonas utilizando  $\text{NaBH}_4$  o  $\text{LiAlH}_4$ <sup>[83]</sup>; (2) o mediante un proceso selectivo de *o*-litiación de anilinas seguido de una condensación con aldehídos aromáticos<sup>[93]</sup>.

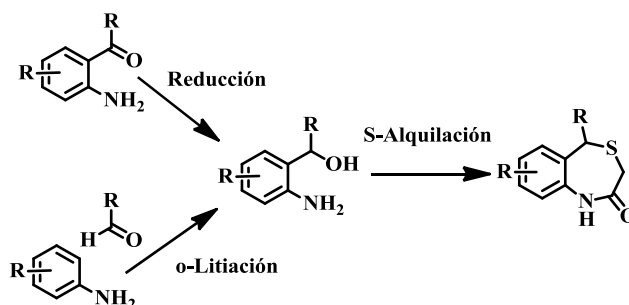


Figura 11. - Posibles rutas sintéticas para la obtención de 4,1-benzotiazepinas sustituidas.

En la actualidad debido al incipiente auge de la química verde y de la síntesis orgánica asistida por microondas, se están consiguiendo importantes avances en la síntesis de 4,1-benzotiazepinas, minimizando el número de pasos sintéticos<sup>[94]</sup>.

<sup>91</sup> a) Kuch,H.; Seidl, G.; Schmitt, K. (1967) *Arch. Pharm.* **300**:4:299. b) Klosa, J. (1967) *J. Prakt. Chem.(Leipzig)*. **3**:1-2:5. c) Yukimasa, H.; Miki, T. (1996) *Jpn. Kokai Tokyo Koho.* **16**.

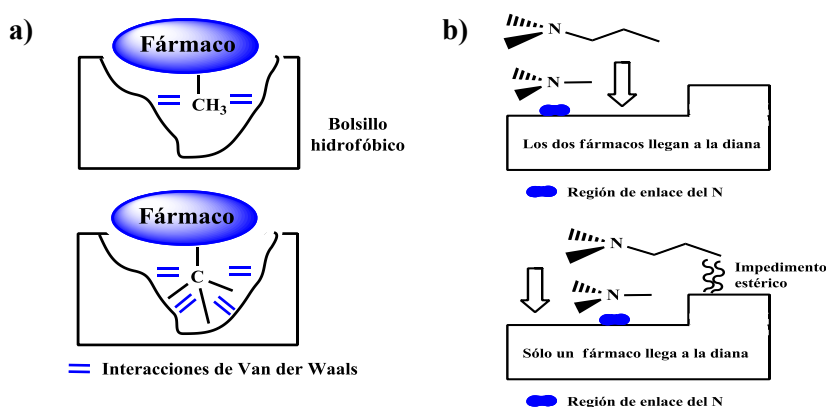
<sup>92</sup> Hirai, K.S.; Matsutani, T.; Ishiba, I. (1981) *U.S. Patent* **4**:297-280.

<sup>93</sup> a) Turner, J.A. (1990) A general approach to the synthesis of 1,6-, 1,7-, and 1,8-naphthyridines. *J. Org. Chem.* **55**:4744-4750. b) Úbeda, J.I.; Villacampa, M.; Avendaño, C. (1998) Friedländer Synthesis of Substituted Quinolines from N-Pivaloylanilines. *Synthesis*. **8**:1176-1180.

<sup>94</sup> Tu, S.J.; Cao, X.D.; Hao, W.J.; Zhang, X.H.; Yan, S.; Wu, S.S.; Han, Z.G.; Shi, F. (2009) An efficient and chemoselective synthesis of benzo[*e*][1,4]thiazepin-2-(1*H*,3*H*,5*H*)-ones via a microwave-assisted multi-component reaction in water. *Org. Biomol. Chem.* **7**:557-563.

### 1.5.2. - Farmacomodulación de las benzotiazepinas

Todas las modificaciones que pueden llevarse a cabo en la estructura de las benzotiazepinas para mejorar su actividad biológica vienen determinadas por las relaciones estructura-actividad. A modo de ejemplo, una modificación química puede aumentar la interacción entre el fármaco y la diana farmacológica, (**figura 12a**), mediante la introducción de un grupo voluminoso que favorezca interacciones hidrofóbicas entre sustrato y receptor. Por el contrario, si se necesita aumentar la selectividad de dicho fármaco sobre una diana concreta (**figura 12b**) la incorporación de una cadena carbonada más larga perjudicaría la interacción del fármaco con la diana no deseada (receptor 2), haciendo que solo tenga actividad sobre la diana objeto de estudio (receptor 1).



**Figura 12. - Modulación farmacodinámica mediante el aumento de cadenas hidrocarbonadas<sup>[95]</sup>.**

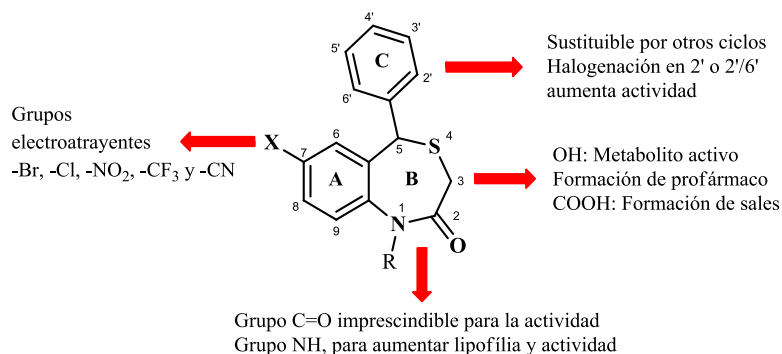
Para llevar a cabo cambios estructurales que no modifiquen dramáticamente la molécula, se puede seguir la estrategia del bioisosterismo. Desde un punto de vista clásico, isósteres son aquellos átomos o grupos de átomos que tienen la misma valencia o número de electrones no enlazados, y

<sup>95</sup> Patrick, G.L. (2009) An introduction to Medicinal Chemistry. Editorial Oxford University Press.

que presentan similares propiedades físicoquímicas. Por otra parte, bioisósteres son aquellos átomos o grupos de átomos diferentes que aportan a la molécula similares propiedades biológicas. El concepto de bioisosterismo<sup>[96]</sup>, que constituye uno de los métodos más frecuentes de farmacomodulación, tiene en cuenta criterios diversos, entre los que cabe considerar:

- Tamaño o volumen de los grupos.
- Ángulos de hibridación.
- Distribución electrónica, polarizabilidad, efectos inductivos, cargas, dipolos y otras propiedades relativas a los efectos electrónicos.
- Solubilidad en lípidos (lipofilia).
- Acidez (pKa).
- Capacidad de formar enlaces de hidrógeno.

Utilizando un bioisóster para un grupo funcional presente en un compuesto cabeza de serie, se garantiza que el nuevo compuesto no modifique drásticamente su actividad biológica, pudiendo conseguir una mejora en las propiedades farmacocinéticas o en la estabilidad metabólica. Si estas premisas se aplican a la familia de las 4,1-benzotiazepinas, basándonos en las contribuciones encontradas en la literatura, la farmacomodulación que podemos aplicar en este tipo de estructuras se puede resumir en la siguiente figura;



**Figura 13. - Farmacomodulación en las 4,1-benzotiazepinas.**

<sup>96</sup> Delgado-Cirilo, A.; Minguillón-Llombart, C.; Joglar-Tamargo, J. (2000) Introducción a la Química Terapéutica. Editorial Promociones y Publicaciones Universitarias.

Del estudio farmacológico de las numerosas benzotiazepinas sintetizadas, se pueden enumerar las siguientes premisas, según las relaciones estructura-actividad<sup>[96,97]</sup>.

- El sistema carbonílico de la posición 2 es importante para la actividad de estos compuestos. La sustitución de este grupo por un grupo tiocarbonilo (C=S) o metileno (-CH<sub>2</sub>) suele conducir a compuestos poco activos que requieren un proceso de bioactivación metabólica por hidrólisis o por oxidación.
- En el anillo A, el grupo X, en posición 7, debe ser electroatrayente, siendo -Br, -Cl, -NO<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub> y -CN los más frecuentes. La actividad disminuye en gran medida por introducción de sustituyentes adicionales en este anillo o por cambios de posición dentro del anillo.
- El sustituyente R sobre el átomo de nitrógeno de la posición 1 puede ser -H, -CH<sub>3</sub> o bien algún grupo que aumente la lipofilia de la molécula, permitiendo un mejor paso por la barrera hematoencefálica para compuestos con diana farmacológica en el sistema nervioso central.
- La sustitución de la posición 3 conduce en general a compuestos menos potentes. No obstante, la incorporación de ciertos grupos (-OH, -COOH) permite la formación de profármacos con ventajosas propiedades farmacocinéticas.
- Suele ser frecuente la introducción de átomos de halógeno sobre las posiciones 2' ó 2',6' del grupo fenilo en C5 del sistema de benzotiazepina (anillo C). También es frecuente el cambio del sistema aromático por otros sistemas bioisostéricos.

En esta memoria nos vamos a centrar en la reconocida actividad bloqueante del mNCX llevada a cabo por las 4,1-benzotiazepinas. Este bloqueo

---

<sup>97</sup> Hadjipavlou-Litina, D.; Garg, R.; Hansch, C. (2004) Comparative Quantitative Structure-Activity Relationship Studies (QSAR) on Non-Benzodiazepine Compounds Binding to Benzodiazepine Receptor (BzR). *Chem. Rev.* **104**:3751-3793.

modifica el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana mitocondrial, afectando a la función mitocondrial.

## 1.6. - CGP37157 como bloqueante del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ mitocondrial

### 1.6.1. - Descubrimiento del *mNCX*

Los estudios realizados en la década de los 60 identificaron y caracterizaron la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  en mitocondrias aisladas. Esos estudios se centraron mayoritariamente en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE hasta la mitocondria. Pronto se vio que esa captación masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  debería ser equilibrada con una liberación posterior de dicho  $\text{Ca}^{2+}$ . Mientras que el  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  no lograron producir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial ( $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ ), sí se descubrió que se producía un intensa liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  cuando se añadía  $\text{Na}^+$ . Además, sorprendentemente, el  $\text{Li}^+$  fue el único catión monovalente capaz de sustituir al  $\text{Na}^+$  en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$  [98,99].

Este descubrimiento era contrario a la estricta selectividad que presenta el NCX de la membrana plasmática, lo que puso de manifiesto que ambos intercambiadores eran distintos [100]. Los estudios iniciales sugirieron que el intercambio de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  a nivel mitocondrial era altamente activo en las células cardiacas y neuronales, mientras que el intercambio  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  a nivel mitocondrial era más predominante en el hígado y otros tejidos no excitables. Estudios posteriores demostraron que la actividad de intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

<sup>98</sup> Carafoli, E.; Tiozzo, R.; Lugli, G.; Croveti, F.; Kratzig, C. (1974) The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 6:4:361-371.

<sup>99</sup> Carafoli, E.; Malmstrom, K.; Sigel, E.; Crompton, M. (1976) The regulation of intracellular calcium. *Clinical Endocrinology.* 5:S49-S59.

<sup>100</sup> Blaustein, M.P.; Lederer, W.J. (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Rev.* 79:3:763-854.

mitocondrial es un fenómeno ubicuo y fisiológicamente relevante en la mayoría de los tipos de células examinados<sup>[101]</sup>.

La incapacidad para identificar el intercambiador mitocondrial contribuyó a la hipótesis de que las isoformas del intercambiador de la membrana plasmática estaban dirigidas a la mitocondria, y que eran ellas las encargadas de realizar el proceso de intercambio. La presencia de las tres isoformas NCX1 en fracciones mitocondriales aisladas "*in situ*", por inmunotransferencias y microscopía inmunoelectrónica en tejido cerebral, apoyaba esta hipótesis<sup>[102]</sup>. Sin embargo, hubo varias líneas de investigación que daban evidencias en contra de esta teoría. Un análisis similar realizado por otros laboratorios no detectó las isoformas NCX en la mitocondria. Tal vez, lo más importante fue que la selectividad de los cationes y la sensibilidad de inhibición en el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en su forma purificada eran distintas de la de todas las isoformas de NCX de la membrana plasmática<sup>[103]</sup>. Estas discrepancias indicaban que la identificación molecular del mNCX se mantenía todavía oculta.

La identificación molecular del mNCX se realizó de forma inesperada y a partir de una línea de investigación totalmente diferente. Mientras estudiaban la homeostasia celular del  $\text{Zn}^{2+}$ , habiendo identificado un intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Zn}^{2+}$  en células HEK293 y neuronas<sup>[104]</sup>, se vio que la actividad de este intercambiador era esencial para la generación de un gradiente transmembrana de  $\text{Zn}^{2+}$  y que, además, ese gradiente estaba vinculado a una señalización y

<sup>101</sup> Crompton, M.; Kunzi, M.; Carafoli, E. (1977) The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier. *Eur. J. Biochem. FEBS*. **79**:2:549-558.

<sup>102</sup> Minelli, A. (2007) Cellular and subcellular localization of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium*. **41**:3:221-234.

<sup>103</sup> Paucek, P.; Jaburek, M. (2004) Kinetics and ion specificity of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange mediated by the reconstituted beef heart mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiporter. *Biochem. Biophys. Acta*. **1659**:1:83-91.

<sup>104</sup> Ohana, E. (2004) A sodium zinc exchange mechanism is mediating extrusion of zinc in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **279**:6:4278-4284.

actividad de  $\text{Zn}^{2+}$  a proteínas de unión, y que el colapso del gradiente o la inversión del intercambiador conducían a la muerte neuronal<sup>[105]</sup>. Debido a que el comportamiento cinético del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Zn}^{2+}$  compartía ciertas propiedades conocidas del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , como la electrogenicidad y el cambio de direccionalidad dependiente de los cationes, se pensó que el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Zn}^{2+}$  podía pertenecer a una familia del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . Siguiendo esa línea de razonamiento, se clonó un nuevo miembro de la familia del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que se denominó FLJ22233 y cuya función era desconocida. El análisis filogenético indicó que no pertenecía a ninguna de las subfamilias de intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  de mamíferos, NCX y NCKX<sup>[105]</sup>. Además, se descubrió que al expresarse en células HEK293 mediaba en el intercambio de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  pero no en el  $\text{Na}^+/\text{Zn}^{2+}$ . Estudios posteriores demostraron que  $\text{Na}^+$  podía reemplazarse por  $\text{Li}^+$ , que suele ser un catión inerte para todos los NCX de la membrana plasmática, sin provocar una reversión del flujo de salida del  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[12]</sup>. En base a esto, a este intercambiador se le denomina intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$ <sup>[12]</sup>, NCLX por sus siglas en inglés "*Sodium Calcium Lithium Exchanger*".

Estudios realizados con microscopía inmunoelectrónica revelaron que el NCLX se encuentra en la membrana interna mitocondrial y la expresión de dicho intercambiador conduce a un aumento del flujo de salida de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial que se puede ver bloqueada por **CGP37157**. Finalmente, utilizando células permeabilizadas con digitonina se demostró que el NCLX está mediando en el intercambio mitocondrial de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Li}^+/\text{Ca}^{2+}$ , por lo que la localización y el análisis funcional han mostrado ser evidencias muy fuertes para poder concluir que el NCLX es el mNCX largamente buscado<sup>[12]</sup>.

---

<sup>105</sup> Cai, X.; Lytton, J. (2004) The cation/Ca(2+) exchanger superfamily: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol. Bio. Evo.* **21**:9:1692-1703.

Uno de los bloqueantes del mNCX es el compuesto **CGP37157**. Dicho compuesto ha sido extensamente utilizado para caracterizar el funcionamiento de dicho intercambiador<sup>[106]</sup>.

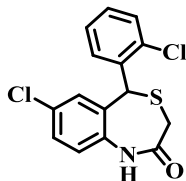


Figura 14. - Estructura del 7-cloro-5-(2'-clorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2-(3H)-ona (**CGP37157**).

El creciente reconocimiento de la importancia fisiológica del mNCX en tejidos primarios y líneas celulares provocó una búsqueda de inhibidores eficaces y selectivos para ser utilizados en estudios fisiológicos. Los primeros compuestos ensayados eran varios bloqueantes de los CCVD, como el *D-cis*-Diltiazem y el Clonazepam<sup>[107]</sup>; estos compuestos producían una inhibición en el mNCX, pero también con otros canales o receptores<sup>[108]</sup>, lo que limitaba su uso. A raíz de estos hallazgos, se realizaron esfuerzos para mejorar la selectividad de las benzotiazepinas hacia el mNCX, obteniéndose **CGP37157**<sup>[106]</sup>. La afinidad de **CGP37157** fue al menos 10 veces mayor que la de otros inhibidores conocidos. En células cardíacas, **CGP37157** no interfirió con la contracción ni afectó a los CCVD de tipo L, ni a la SERCA. También se vio que **CGP37157** no interaccionaba con los NCX de la membrana plasmática. Estudios comparativos mostraron que al menos una concentración 10 veces mayor de **CGP37157** se requiere para inhibir el NCX de la membrana plasmática, e incluso a estas concentraciones tan altas, la inhibición es solo parcial<sup>[109]</sup> (tabla

<sup>106</sup> Chiesi, M.; Schwaller, R.; Eichenberger, K. (1988) Structural dependency of the inhibitory action of benzodiazepines and related compounds on the mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Biochem. Pharmacol.* **37**:22:4399-4403.

<sup>107</sup> Vaghy, P.L.; Johnson, J.D.; Matlib, M.A.; Wang, T.; Schwartz, A. (1982) Selective inhibition of  $\text{Na}^+$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from heart mitochondria by diltiazem and certain other  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist drugs. *J. Bio. Chem.* **257**:11:6000-6002.

<sup>108</sup> Kinnally, K.W. (1993) Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:4:1374-1378.

<sup>109</sup> Czyz, A.; Kiedrowski, L. (2003) Inhibition of plasmalemmal  $\text{Na}(+)/\text{Ca}(2+)$  exchange by mitochondrial  $\text{Na}(+)/\text{Ca}(2+)$  exchange inhibitor 7-chloro-5-(2'-chlorophenyl)-1,5-dihydro-4,1-



5). Profundizando en esta benzotiazepina, en estudios realizados con mitocondrias aisladas de corazón humano<sup>[110]</sup>, se vio que **CGP37157** presentaba una mejor inhibición frente a este intercambiador, 10 veces más potente, que otras benzotiazepinas como el *D-cis*-Diltiazem u otras benzodiazepinas como el Clonazepam. Posteriormente, en estudios realizados<sup>[111]</sup> en mitocondria aislada de corazón humano, pero evaluando **CGP37157** frente a otros posibles candidatos a reguladores del  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ , se demostró que seguía siendo uno de los mejores compuestos a la hora de inhibir este intercambiador. (**tabla 5**).

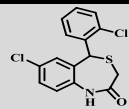
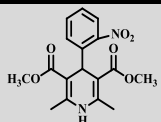
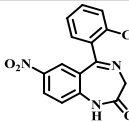
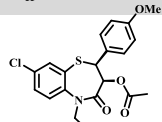
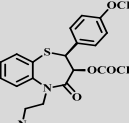
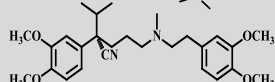
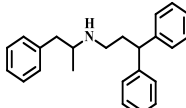
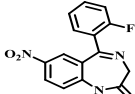
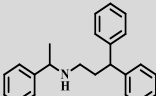
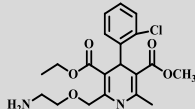
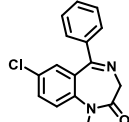
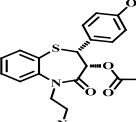
---

benzothiazepin-2(3H)-one (CGP37157) in cerebellar granule cells. *Biochem. Pharma.* **66**:12:2409-2411.

<sup>110</sup> Cox, D.A.; Conforti, L.; Sperelakis, N.; Matlib, M.A. (1993) Selectivity of inhibition of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange of heart mitochondria by benzothiazepine CGP37157 *J. Card. Pharm.* **21**:595-599.

<sup>111</sup> Cox, D.A.; Matlib, M.A. (1993) Modulation of intramitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by antagonists of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Trends Pharmacol. Sci* **14**:408-413.

Tabla 5. - Potencia de diversos compuestos con actividad inhibitoria del mNCX en mitocondrias aisladas de corazón.

Compuesto	Clase química	CI <sub>50</sub> (μM)(*)	Compuesto	Clase química	CI <sub>50</sub> (μM)(*)		
	CGP37157	Benzotiazepina	0,4		Nifedipino	Dihidropiridina	66
	Clonazepam	Benzodiazepina	7,0		Clentiazem	Benzotiazepina	70
	<i>D-cis-</i> Diltiazem	Benzotiazepina	7,0		Verapamilo	Fenilalquilamina	150
	Prenilamina	Fenilalquilamina	12		Flunitrazepam	Benzodiazepina	156
	Fendilina	Fenilalquilamina	13		Amlodipino	Dihidropiridina	200
	Diazepam	Benzodiazepina	40		<i>L-cis-</i> Diltiazem	Benzotiazepina	350

(\*) CI<sub>50</sub> es la concentración de compuestos requerida para inhibir la actividad de intercambio del  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  en un 50%.

**CGP37157** inhibió la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria a través del mNCX en cultivos de neuronas de cerebro anterior de rata<sup>[112]</sup>. El aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$  en la mitocondria por la exposición a **CGP37157** ejerce un efecto regulador de la homeostasia del  $\text{Ca}^{2+}$  celular, como se observó al inducir despolarización en cultivos de neuronas ganglionares de la raíz dorsal y, por consiguiente, aumentando el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular<sup>[113]</sup>. Este efecto regulador no solo tiene implicaciones terapéuticas a nivel central. Así, **CGP37157** y sus derivados han sido estudiados para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II. Aquí, la regulación del metabolismo mitocondrial influye en la secreción de insulina en células  $\beta$ -pancreáticas<sup>[114]</sup>.

El mNCX está también siendo objeto de estudio para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central<sup>[13]</sup>. Evidencias experimentales sugieren que la activación suprafisiológica del mNCX contribuye a la muerte celular neuronal en el cerebro isquémico. Además, el mNCX está involucrado en: (1) el control de la forma y duración de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  en respuesta a los neurotransmisores y los potenciales de acción, (2) la liberación de neurotransmisores, (3) plasticidad sináptica, (4) la bioenergética neuronal, y (5) la generación de radicales libres y NO en la mitocondria. El papel de las mitocondrias en las enfermedades neurodegenerativas se ha investigado intensamente en los últimos años debido a su papel principal en la síntesis de ATP, su capacidad de producir ROS, óxido nítrico y sus derivados, y para liberar factores apoptogénicos en el citosol, lo que desencadena la muerte celular apoptótica. Estos hechos muestran que el mNCX podría estar implicado en la fisiopatología de la isquemia cerebral, la epilepsia y las principales enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, sugiriendo que el mNCX

---

<sup>112</sup> White, R.J.; Reynolds, I.J. (1997) Mitochondria accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  following intense glutamate stimulation of cultured rat forebrain neurones. *J. Physiology*. **498**:1:31-47.

<sup>113</sup> Baron, K.T.; Thayer, S.A. (1997) CGP37157 modulates mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Eur. J. Pharm.* **340**:295-300.

<sup>114</sup> Wollheim, C.B. (2000) Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in Type II diabetes. *Diabetologia*. 43:265-277.

podría ser una diana farmacológica interesante para el desarrollo de nuevos fármacos para tratar estas enfermedades<sup>[13,115]</sup>.

---

<sup>115</sup> Nicolau, S.M. (2010) La mitocondria, una diana para la neuroprotección farmacológica. *Tesis Doctoral, UAM*.

## 1.7. - Bibliografía

- [1] Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**:7:517-529.
- [2] Berridge, M.J. (1997) Elementary and global aspects of calcium signaling. *J. Exp. Biol.* **200**:2:315-319.
- [3] Carafoli, E. (2005) Calcium -a universal carrier of biological signal. *FEBS Journal.* **272**:1073-1089.
- [4] Guerini, D.; Coletto, L.; Carafoli, E. (2005) Exporting calcium from cells. *Cell Calcium.* **38**:3-4:281-289.
- [5] Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2002) Molecular Biology of the Cell. 4<sup>a</sup> edition. *Science.* 767-829.
- [6] Vasington, F.D. (1963) Calcium ion uptake by fragments of rat liver mitochondria and its dependence on electron transport. *J. Biol. Chem.* **238**:1841-1847.
- [7] Carafoli, E. (1979) The calcium cycle of mitochondria. *FEBS Lett.* **104**:1-5.
- [8] a) De Stefani, D.; Raffaello, A.; Teardo, E.; Szabò, I.; Rizzuto, R. (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* **476**:7360:336-340. b) Baughman, J.M.; Perocchi, F.; Girgis, H.S.; Plovanich, M.; Belcer-Timme, C.A.; Sancak, Y.; Bao, X.R.; Strittmatter, L.; Goldberger, O.; Bogorad, R.L.; Koteliansky, V.; Mootha, V.K. (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* **476**:7360:341-345.
- [9] Álvarez, J.; Montero, M.; García-Sancho, J. (1999) Subcellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics. *News Physiol. Sci.* **14**:161-168.
- [10] Hajnóczky, G.; Csordás, G.; Das, S.; García-Pérez, C.; Saotome, M.; Sinha-Roy, S.; Yi, M. (2006) Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in apoptosis. *Cell Calcium.* **40**:5-6:553-560.
- [11] Babcock, D.F.; Hillet, B. (1998) Mitochondrial oversight of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling. *Curr. Op. Neurobiol.* **8**:398-404.
- [12] Palty, R.; Silverman, W.F.; Hershfinkel, M.; Caporale, T.; Sensi, S.L.; Parnis, J.; Nolte, C.; Fishman, D.; Shoshan-Barmatz, V.; Herrmann, S.; Khananshvil, D.; Sekler, I. (2010) NCLX is an essential component of mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**:1:436-41.

- [13] Castaldo, P.; Cataldi, M.; Magi, S.; Lariccia, V.; Arcangeli, S.; Amoroso, S. (2009) Role of the mitochondrial sodium/calcium exchanger in neuronal physiology and in the pathogenesis of neurological diseases. *Progress in Neurobiology*. **87**:58-79.
- [14] Zoratti, M.; Szabb, I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta*. **1241**:139-176.
- [15] Lemasters, J.J.; Theruvath, T.P.; Zhong, Z.; Nieminen, A.L. (2009). Mitochondrial calcium and permeability transition in cell death. *Biochim. Biophys. Acta*. **1787**:11:1395-1401.
- [16] Wallace, D.C. (2010) Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol.* **5**:297-348.
- [17] Smith, R.A.J.; Hartley, R.C.; Cochemé, H.M.; Murphy, M.P. (2012) Mitochondrial pharmacology. *Trends. Phar. Sci.* **33**:6:341-352.
- [18] Rasola, A.; Bernardi, P. (2011) Mitochondrial permeability transition in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*. **50**:222-233.
- [19] Atamna, H.; Kumar, R. (2010) Protective role of methylene blue in Alzheimer's disease via mitochondria and cytochrome c oxidase. *J. Alzheimer's. Dis.* **20**:(Suppl.2):S439-S452.
- [20] Haefeli, R.H.; Erb, M.; Gemperli, A.C.; Robay, D.; Fruh, I.F.; Anklin, C.; Dallmann, R.; Gueven, N. (2011) NQO1-dependent redox cycling of idebenone: effects on cellular redox potential and energy levels. *PLoS ONE*. **6**:17963.
- [21] Fash, D.M.; Khmour, O.M.; Sahdeo, S.J.; Goldschmidt, R.; Jaruvangsanti, J.; Dey, S.; Arce, P.M.; Collin, V.C.; Cortopassi, G.A.; Hecht, S.M. (2013) Effects of alkyl side chain modification of coenzyme Q10 on mitochondrial respiratory chain function and cytoprotection. *Bioorg. Med.Chem.* **21**:2346-2354.
- [22] Bezprozvanny, I. (2009) Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* **15**:89-100.
- [23] Abou-Sleiman, P.M.; Muqit, M.M.; Wood, N.W. (2006) Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**:207-219.
- [24] Gagliardi, S.; Cova, E.; Davin, A.; Guareschi, S.; Abel, K.; Alvisi, E.; Laforenza, U.; Ghidoni, R.; Cashman, J.R.; Ceroni, M.; Cereda, C. (2010) SOD1 mRNA expression in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **39**:2:198-203.
- [25] Monk, P.N.; Shaw, P.J. (2006) ALS: life and death in a bad neighborhood. *Nat. Med.* **12**:885-887.

- [26] Gusella, J.F.; MacDonald, M.E. (2000) Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**:109-115.
- [27] Watase, K.; Barrett, C.F.; Miyazaki, T.; Ishiguro, T.; Ishikawa, K.; Hu, Y.; Unno, T.; Sun, Y.; Kasai, S.; Watanabe, M.; Gomez, C.M.; Mizusawa, H.; Tsien, R.W.; Zoghbi, H.Y. (2008) Spinocerebellar ataxia type 6 knockin mice develop a progressive neuronal dysfunction with age-dependent accumulation of mutant Ca<sub>v</sub>2.1 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**:11987-11992.
- [28] Giannakopoulos, P.; Kovari, E.; Gold, G.; Von Gunten, A.; Hof, P.R.; Bouras, C. (2009) Pathological substrates of cognitive decline in Alzheimer's disease. *Front. Neurol. Neurosci.* **24**:20-29.
- [29] Hardy, J.; Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* **297**:353-356.
- [30] Murray, F.E.; Landsberg, J.P.; Williams, R.J.; Esiri, M.M.; Watt, F. (1992) Elemental analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease using protoninduced X-ray analysis. *Ciba. Found. Symp.* **169**:201-210.
- [31] Hensley, K.; Carney, J.M.; Mattson, M.P.; Aksenova, M.; Harris, M.; Wu, J.F.; Floyd, R.; Butterfield, D.A. (1994) A model for  $\beta$ -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:3270-3274.
- [32] a) Mark, R.J.; Hensley, K.; Butterfield, D.A.; Mattson, M.P. (1995) Amyloid  $\beta$ -peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cell death. *J. Neurosci.* **15**:6239-6249. b) Mark, R.J.; Keller, J.N.; Kruman, I.; Mattson, M.P. (1997) Basic FGF attenuates amyloid  $\beta$ -peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in hippocampal neurons. *Brain Res.* **756**:205-214.
- [33] Kawahara, M.; Kuroda, Y. (2000) Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's  $\beta$ -amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res. Bull.* **53**:389-397.
- [34] Berridge, M.J. (2010) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers. Arch-Eur. J. Physiol.* **459**:441-449.
- [35] Rizzuto, R.; Brini, M.; Murgia, M.; Pozzan, T. (1993) Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* **262**:5134-744-747.
- [36] Berridge, M.J. (2011) Calcium Signalling and Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* **36**:1149-1156.

- [37] Sulzer, D. (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **30**:244-250.
- [38] Volles, M.J. (2001) Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry.* **40**:7812-7819.
- [39] Danzer, K.M. (2007) Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J. Neurosci.* **27**:9220-9232.
- [40] Furukawa, K. (2006) Plasma membrane ion permeability induced by mutant alpha-synuclein contributes to the degeneration of neural cells. *J. Neurochem.* **97**:1071-1077.
- [41] Surmeier, D.J. (2007) Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **6**:933-938.
- [42] Chan, C.S. (2007) 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature.* **447**:1081-1086.
- [43] Gandhi, S.; Wood-Kaczmar, A.; Yao, Z.; Plun-Favreau, H.; Deas, E.; Klupsch, K.; Downward, J.; Latchman, D.S.; Tabrizi, S.J.; Wood, N.W.; Duchen, M.R.; Abramov A.Y. (2009) PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol. Cell.* **33**:627-638.
- [44] Grünewald, A.; Gegg, M.E.; Taanman, J.W.; King, R.H.; Kock, N.; Klein, C.; Schapira, A.H.V. (2009) Differential effects of PINK1 nonsense and missense mutations on mitochondrial function and morphology. *Exp. Neurol.* **219**:266-273.
- [45] Guzmán, J.N.; Sánchez-Padilla, J.; Wokosin, D.; Kondapalli, J.; Ilijic, E.; Schumacker, P.T.; Surmeier, D.J. (2010) Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature.* **468**:696-700.
- [46] Batelli, S.; Albani, D.; Rametta, R.; Polito, L.; Prato, F.; Pesaresi, M.; Negro, A.; Forloni, G. (2008) DJ-1 modulates alpha-synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress: relevance for Parkinson's disease and involvement of HSP70. *PLoS One.* **3**:e1884.
- [47] Li, W.W.; Yang, R.; Guo, J.C. (2007) Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport.* **8**:1543-1546.
- [48] Liu, G.; Zhang, C.; Yin, J. (2009) alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci. Lett.* **454**:187-192.



- [49] Bajpai, P.; Sangar, M.C.; Singh, S.; Tang, W.; Bansal, S.; Chowdhury, G.; Cheng, Q.; Fang, J.K.; Martin, M.V.; Guengerich, F.P.; Avadhani, N.G. (2013). Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by mitochondrion-targeted cytochrome P450-2D6: implications in Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* **288**:6:4436-4451.
- [50] Ossowska, K.; Smialowska, M.; Kuter, K.; Wieronska, J.; Zieba, B.; Wardas, J.; Nowak, P.; Dabrowska, J.; Bortel, A.; Biedka, I.; Schulze, G.; and Rommelspacher, H. (2006) Degeneration of dopaminergic mesocortical neurons and activation of compensatory processes induced by a long-term paraquat administration in rats: Implications for Parkinson's disease. *Neuroscience*. **141**:4:2155-2165.
- [51] Cleveland, D.W.; Rothstein, J.D. (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**:806-819.
- [52] a) Choi, D.W. (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity, *J. Neurosci.* **7**:369–379. b) Van Den Bosch, L.; Vandenbergh, W.; Klaassen, H.; Van Houtte, E.; Robberecht, W. (2000)  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons, *J. Neurol. Sci.* **180**:29-34.
- [53] Van Den Bosch, L.; Van Damme, P.; Bogaert, E.; Robberecht, W. (2006) The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1762**:1068-1082.
- [54] Appel, S.H. (2001) Calcium: the Darth Vader of ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **2**:Suppl. 1:S47-S54.
- [55] Yáñez, M.; Galán, L.; Matías-Guiu, J.; Vela, A.; Guerrero, A; García, A.G. (2011) CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients produces glutamate independent death of rat motor brain cortical neurons: Protection by resveratrol but not riluzole. *Brain Research.* **1423**:77-86.
- [56] a) Carriedo, S.G.; Sensi, S.L.; Yin, H.Z.; Weiss, J.H. (2000) AMPA exposures induce mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J. Neurosci.* **20**:240-250. b) Urushitani, M.; Nakamizo, T.; Inoue, R.; Sawada, H.; Kihara, T.; Honda, K.; Akaike, A.; Shimohama, S. (2001) N-methyl-D-aspartate receptor mediated mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload in acute excitotoxic motor neuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after  $\text{Ca}^{2+}$  influx, *J. Neurosci. Res.* **63**:377-387.
- [57] Jaarsma, D.; Rognoni, F.; Van Duijn, W.; Verspaget, H.W.; Haasdijk, E.D.; Holstege, J.C. (2001) CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol.* **102**:293-305.

- [58] Jung, C.; Higgins, C.M.; Xu, Z. (2002) Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurochem.* **83**:535-545.
- [59] Takeuchi, H.; Kobayashi, Y.; Ishigaki, S.; Doyu, M.; Sobue, G. (2002) Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **277**:50966-50972.
- [60] Damiano, M.; Starkov, A.A.; Petri, S.; Kipiani, K.; Kiaei, M.; Mattiazzi, M.; Flint-Beal, M.; Manfredi, G. (2006) Neural mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J. Neurochem.* **96**:1349-1361.
- [61] Li, S.; Li, X.J. (2006) Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington disease. *Mol. Neurodegener.* **1**:19.
- [62] Tang, T.S. (2003) Huntingtin and huntingtin-associated protein-1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5)triphosphate receptor type 1. *Neuron.* **39**:227-239.
- [63] Zeron, M.M. (2002) Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron.* **33**:849-860.
- [64] Kaltenbach, L.S.; Romero, E.; Becklin, R.R.; Chettier, R.; Bell, R.; Phansalkar, A.; Strand, A.; Torcassi, C.; Savage, J.; Hurlburt, A.; Cha, G.H.; Ukani, L.; Chepanoske, C.L.; Zhen, Y.; Sahasrabudhe, S.; Olson, J.; Kurschner, C.; Ellerby, L.M.; Peltier, J.M.; Botas, J.; Hughes, R.E. (2007) Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet.* **3**:e82.
- [65] Swayne, L.A.; Chen, L.; Hameed, S.; Barr, W.; Charlesworth, E.; Colicos, M.A.; Zamponi, G.W.; Braun, J.E.A. (2005) Crosstalk between huntingtin and syntaxin-1A regulates N-type calcium channels. *Mol. Cell. Neurosci.* **30**:339-351.
- [66] Lim, D.; Fedrizzi, L.; Tartari, M.; Zuccato, C.; Cattaneo, E.; Brini, M.; and Carafoli, E. (2008) Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease. *J. Biol. Chem.* **283**:5780-5789.
- [67] a) Orr, A.L.; Li, S.; Wang, C.E.; Li, H.; Wang, J.; Rong, J.; Xu, X.; Mastroberardino, P.G.; Greenamyre, J.T.; Li, X.J. (2008) N-terminal mutant huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J. Neurosci.* **28**:2783-2792. b) Panov, A.V.; Gutekunst, C.A.; Leavitt, B.R.; Hayden, M.R.; Burke, J.R.; Strittmatter, W.J.; Greenamyre, J.T. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* **5**:731-736.

- [68] Huynh, D.P.; Figueroa, K.; Hoang, N.; Pulst, S.M. (2000) Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat. Genet.* **26**:44-50.
- [69] Magaña, J.J.; Velázquez-Pérez, L.; Cisneros, B. (2013) Spinocerebellar Ataxia Type 2: Clinical Presentation, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Perspectives. *Mol. Neurobiol.* **47**:90-104.
- [70] Underwood, B.R.; Rubinsztein, D.C. (2008) Spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions: a review of therapeutic strategies. *Cerebellum.* **7**:2:215-221.
- [71] Catterall, W.A.; Striessnig, J.; Snutch, T.P.; Pérez-Reyes, E. (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Calcium Channels. *Pharmacol. Rev.* **55**:579-581.
- [72] Kalia, L.V.; Kalia, S.K.; Salter, M.W. (2008) NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol.* **7**:742-755.
- [73] Williams, K.; Dawson, V.L.; Romano, C.; Dichter, M.A.; Molinoff, P.B. (1990) Characterization of polyamines having agonist, antagonist and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. *Neuron.* **5**:199-208.
- [74] Watkins, J.C.; Evans, R.H. (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **21**:165-204.
- [75] Chen, H.S.; Lipton, S.A. (2005) Pharmacological implications of two distinct mechanisms of interaction of memantine with N-methyl-D-aspartate-gated channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**:961-971.
- [76] Levai, A. (1995) Synthesis of benzothiazepines. *Trends. Heterocycl. Chem.* **4**:51-69.
- [77] Levai, A. (2000) Synthesis and Chemical Transformation of 1,5-Benzothiazepines. *J. Heterocycl. Chem.* **37**:199-214.
- [78] Tollefson, M.B.; Kolodziej, S.A.; Fletcher, T.R.; Vernier, W.F.; Beaudry, J.A.; Keller, B.T.; Reitz, D.B. (2003) A Novel Class of Apical Sodium Co-dependent Bile Acid Transporter Inhibitors: The 1,2-Benzothiazepines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**:3727-3730.
- [79] Fodor, L.; Csomós, P.; Holczbauer, T.; Kálmán, A.; Csámpai, A.; Sohár, P. (2011) Expected and unexpected reactions of 1,3-benzothiazine derivatives, I. Ring

- transformation of  $\beta$ -lactam-condensed 1,3-benzothiazines into 4,5-dihydro-1,4-benzothiazepines and indolo-1,4-benzothiazepines. *Tetrahedron Lett.* **52**:224-227.
- [80] Bariwal, J.B.; Upadhyay, K.D.; Manvar, A.T.; Trivedi, J.C.; Singh, J.S.; Jain, K.S.; Shah, A.K. (2008) 1,5-Benzothiazepine, a versatile pharmacophore: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **43**:2279-2290.
- [81] Geyer, H.M.; Watzman, N.; Buckley, J.P. (1970) Effects of a tranquilizer and two antidepressants on learned and unlearned behaviors. *J. Pharm. Sci.* **59**:964-968.
- [82] Baron, K.T.; Thayer, S.A. (1997) CGP37157 modulates mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **340**:295-300.
- [83] Pei, Y.; Lilly, M. J.; Owen, D. J.; D'Souza, J.O.; Tang, X.Q.; Yu, J.; Nazarbaghi, R.; Hunter, A.; Anderson, C.M.; Glasco, S.; Ede, J.N.; James, I.W.; Maitra, U.; Chandrasekaran, S.; Moos, W.H.; Ghosh, S.S. (2003) Efficient Syntheses of Benzothiazepines as Antagonists for the Mitochondrial Sodium–Calcium Exchanger: Potential Therapeutics for Type II Diabetes *J. Org. Chem.* **68**:1:92-103.
- [84] Omelchenko, A.; Bouchard, R.; Le, H.D.; Choptiany, P.; Visen, N.; Hnatowich, M.; Hryshko, L.V. (2003) Inhibition of canine (NCX1.1) and *Drosophila* (CALX1.1)  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers by 7-chloro-3,5-dihydro-5-phenyl-1*H*-4,1-benzothiazepine-2-one (CGP-37157) *J. Pharm. Exp. Ther.* **306**:1050-1057.
- [85] Yang, X.; Buzon, L.; Hamanaka, E.; Liu, K.K.C. (2000) Enzymatic resolution of benzothiazepine for the preparation of squalene synthetase inhibitors *Tetrahedron: Asymmetry*. **11**:4447-4450.
- [86] Miki, T.; Kori, M.; Fujishima, A.; Mabuchi, H.; Tozawa, R.T.; Nakamura, M.; Sugiyama, Y.; Yukimasa, H. (2002) Syntheses of fused heterocyclic compounds and their inhibitory activities for squalene synthase. *Bioorg. Med. Chem.* **10**:2:385-400.
- [87] Angibaud, P.; Bourdrez, X.; Devine, A.; End, D. V.; Freyne, E.; Ligny, Y.; Muller, P.; Mannens, G.; Pilatte, I.; Poncelet, V.; Skrzat, S.; Smets, G.; Van Dun, J.; Van Remoortere, P.; Venet, M.; Wouters, W. (2003) 5-Imidazolyl-quinolinones, -quinazolinones and -benzoazepinones as farnesyltransferase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**:9:1543-1547.
- [88] Phippen, C.B.W.; McErlean, C.S.P. (2011) A 1,5-benzothiazepine synthesis. *Tetrahedron Letters*. **52**:1490-1492.
- [89] Uskokovic, M.; Grethe, G.; Iacobelli, J.; Wenner, W. (1965) The Synthesis of 4,1-Benzothiazepines and 5,1-Benzothiazocines. *J. Org. Chem.* **30**:9:3111-3114.

- [90] Venugopal, V.K.; Rao, N.; Rahman, M.F.; Bhalerao, U.T. (1981) *Indian J. Chem.* **20B**:156.
- [91] a) Kuch, H.; Seidl, G.; Schmitt, K. (1967) *Arch. Pharm.* **300**:4:299. b) Klosa, J. (1967) *J. Prakt. Chem.(Leipzig)*. **3**:1-2:5. c) Yukimasa, H.; Miki, T. (1996) *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*. **16**.
- [92] Hirai, K.S.; Matsutani, T.; Ishiba, I. (1981) *U.S. Patent* **4**:297-280.
- [93] Turner, J.A. (1990) A general approach to the synthesis of 1,6-, 1,7-, and 1,8-naphthyridines. *J. Org. Chem.* **55**:4744-4750. b) Úbeda, J.I.; Villacampa, M.; Avendaño, C. (1998) Friedländer Synthesis of Substituted Quinolines from N-Pivaloylanilines. *Synthesis*. **8**:1176-1180.
- [94] Tu, S.J.; Cao, X.D.; Hao, W.J.; Zhang, X.H.; Yan, S.; Wu, S.S.; Han, Z.G.; Shi, F. (2009) An efficient and chemoselective synthesis of benzo[e][1,4]thiazepin-2-(1*H*,3*H*,5*H*)-ones via a microwave-assisted multi-component reaction in water. *Org. Biomol. Chem.* **7**:557-563.
- [95] Patrick, G.L. (2009) An introduction to Medicinal Chemistry. *Editorial Oxford University Press*.
- [96] Delgado-Cirilo, A.; Minguillón-Llombart, C.; Joglar-Tamargo, J. (2000) Introducción a la Química Terapéutica. *Editorial Promociones y Publicaciones Universitarias*.
- [97] Hadjipavlou-Litina, D.; Garg, R.; Hansch, C. (2004) Comparative Quantitative Structure-Activity Relationship Studies (QSAR) on Non-Benzodiazepine Compounds Binding to Benzodiazepine Receptor (BzR). *Chem. Rev.* **104**:3751-3793.
- [98] Carafoli, E.; Tiozzo, R.; Lugli, G.; Crovetti, F.; Kratzing, C. (1974) The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **6**:4:361-371.
- [99] Carafoli, E.; Malmstrom, K.; Sigel, E.; Crompton, M. (1976) The regulation of intracellular calcium. *Clinical Endocrinology*. **5**:S49-S59.
- [100] Blaustein, M.P.; Lederer, W.J. (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Rev.* **79**:3:763-854.
- [101] Crompton, M.; Kunzi, M.; Carafoli, E. (1977) The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier. *Eur. J. Biochem. FEBS*. **79**:2:549-558.

- [102] Minelli, A. (2007) Cellular and subcellular localization of  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$  exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium*. **41**:3:221-234.
- [103] Paucek, P.; Jaburek, M. (2004) Kinetics and ion specificity of  $\text{Na}(+)/\text{Ca}(2+)$  exchange mediated by the reconstituted beef heart mitochondrial  $\text{Na}(+)/\text{Ca}(2+)$  antiporter. *Biochem. Biophys. Acta*. **1659**:1:83-91.
- [104] Ohana, E. (2004) A sodium zinc exchange mechanism is mediating extrusion of zinc in mammalian cells. *J. Biol. Chem*. **279**:6:4278-4284.
- [105] Cai, X.; Lytton, J. (2004) The cation/ $\text{Ca}(2+)$  exchanger superfamily: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol. Bio. Evo*. **21**:9:1692-1703.
- [106] Chiesi, M.; Schwaller, R.; Eichenberger, K. (1988) Structural dependency of the inhibitory action of benzodiazepines and related compounds on the mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Biochem. Pharmacol*. **37**:22:4399-4403.
- [107] Vaghy, P.L.; Johnson, J.D.; Matlib, M.A.; Wang, T.; Schwartz, A. (1982) Selective inhibition of  $\text{Na}^+$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from heart mitochondria by diltiazem and certain other  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist drugs. *J. Bio. Chem*. **257**:11:6000-6002.
- [108] Kinnally, K.W. (1993) Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**:4:1374-1378.
- [109] Czyz, A.; Kiedrowski, L. (2003) Inhibition of plasmalemmal  $\text{Na}(+)/\text{Ca}(2+)$  exchange by mitochondrial  $\text{Na}(+)/\text{Ca}(2+)$  exchange inhibitor 7-chloro-5-(2'-chlorophenyl)-1,5-dihydro-4,1-benzothiazepin-2(3H)-one (CGP37157) in cerebellar granule cells. *Biochem. Pharma*. **66**:12:2409-2411.
- [110] Cox, D.A.; Conforti, L.; Sperelakis, N.; Matlib, M.A. (1993) Selectivity of inhibition of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange of heart mitochondria by benzothiazepine CGP37157. *J. Card. Pharm*. **21**:595-599.
- [111] Cox, D.A.; Matlib, M.A. (1993) Modulation of intramitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by antagonists of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Trends Pharmacol. Sci*. **14**:408-413.
- [112] White, R.J.; Reynolds, I.J. (1997) Mitochondria accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  following intense glutamate stimulation of cultured rat forebrain neurones. *J. Physiology*. **498**:1:31-47.

- [113] Baron, K.T.; Thayer, S.A. (1997) CGP37157 modulates mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Eur. J. Pharm.* **340**:295-300.
- [114] Wollheim, C.B. (2000) Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in Type II diabetes. *Diabetologia*. **43**:265-277.
- [115] Nicolau, S.M. (2010) La mitocondria, una diana para la neuroprotección farmacológica. *Tesis Doctoral, UAM*.





## 2. - Hipótesis

---

**2.1. - Hipótesis de la tesis** **73**

**2.2. - Bibliografía** **75**



## 2. - Hipótesis

### 2.1. - Hipótesis de la tesis

Numerosas investigaciones que se han llevado a cabo sugieren que: (1) las mitocondrias pueden reducir la amplitud de las respuestas de  $[Ca^{2+}]_{cit}$  mediante la captura de  $Ca^{2+}$  desde el citosol, y (2) que retrasan significativamente el retorno a la concentración basal de  $[Ca^{2+}]_{cit}$  por la liberación del  $Ca^{2+}$  capturado de nuevo al citosol una vez que la respuesta se termina<sup>[116]</sup>. El papel que la mitocondria tiene en las enfermedades neurodegenerativas se ha investigado intensamente durante los últimos años, sin embargo, se ha prestado poca atención al mNCX, debido al papel controvertido que tiene en dichas enfermedades, y la falta de herramientas farmacológicas selectivas para diseccionar su actividad.

Algunos investigadores sostienen que si se aumenta la actividad mitocondrial, se produce un aumento en la  $[Ca^{2+}]_{mit}$ , ocasionando estrés oxidativo con el consiguiente aumento de la producción de radicales libres<sup>[117]</sup>, inhibición de enzimas importantes en el ciclo de Krebs<sup>[118]</sup>, y apertura del mPTP, lo que inicia la vía de señalización que conduce a la muerte neuronal por necrosis o apoptosis<sup>[15]</sup>. Otros datos experimentales sugieren que una modulación farmacológica de la mitocondria puede modificar la sensibilidad de esta organela hacia el estrés oxidativo y a otros agentes neurotóxicos<sup>[111,119]</sup>. Se sabe que bloqueando el mNCX mediante **CGP37157** se produce una elevación

<sup>116</sup> Thayer, S.A., Miller, R.J. (1990) Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *J. Physiol.* **425**:85-115.

<sup>117</sup> Peng, T.I.; Jou, M.J. (2010) Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1201**:183-188.

<sup>118</sup> Lai, J.C.; Cooper, A.J. (1986) Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J. Neurochem.* **47**:1376-1386.

<sup>119</sup> Zhang, S.; Hedskog, L.; Petersen, C.A.; Winblad, B.; Ankarcrona, M. (2010) Dimebon (latrepirdine) enhances mitochondrial function and protects neuronal cells from death. *J. Alzheimers. Dis.* **21**:389-402.

sostenida de la  $[Ca^{2+}]_{mit}$ , aumentando así la actividad de las deshidrogenasas, la síntesis de ATP y la contracción del corazón<sup>[111]</sup>.

Así pues, parece claro que el deterioro o el aumento de la función mitocondrial pueden, respectivamente, producir un aumento de muerte neuronal o favorecer la supervivencia de las neuronas vulnerables. En base a todas las evidencias que abordan el control del  $Ca^{2+}$  citosólico que hace la mitocondria, si se modula farmacológicamente uno de los mecanismos implicados en esta regulación de la circulación mitocondrial del  $Ca^{2+}$ , por ejemplo el mNCX, se podría evitar la vulnerabilidad celular producida por la alteración en la regulación de  $Ca^{2+}$ . En este contexto, la sugerencia de que una acumulación de  $Ca^{2+}$  en la mitocondria<sup>[120]</sup> podría desempeñar un papel neuroprotector mediante la eliminación de exceso de  $Ca^{2+}$  en el citoplasma<sup>[121]</sup> encaja muy bien en la hipótesis de nuestro trabajo. Por eso, se planteó hacer derivados de **CGP37157** más potentes y selectivos, y así evaluar si se producía una modificación del perfil neuroprotector y de la homeostasis del  $Ca^{2+}$  por bloqueo del mNCX respecto del cabeza de serie.

---

<sup>120</sup> Nicholls, D.G. (1985) A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? *Prog. Brain Res.* **63**:97-106.

<sup>121</sup> White, R.J.; Reynolds, I.J. (1995) Mitochondrial and  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* **15**:2:1318-1328.

## 2.2. - Bibliografía

- [116] Thayer, S.A.; Miller, R.J. (1990) Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *J. Physiol.* **425**:85-115.
- [117] Peng, T.I.; Jou, M.J. (2010) Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1201**:183-188.
- [118] Lai, J.C.; Cooper, A.J. (1986) Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J. Neurochem.* **47**:1376-1386.
- [119] Zhang, S.; Hedskog, L.; Petersen, C.A.; Winblad, B.; Ankarcrona, M. (2010) Dimebon (latrepirdine) enhances mitochondrial function and protects neuronal cells from death. *J. Alzheimers. Dis.* **21**:389-402.
- [120] Nicholls, D.G. (1985) A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? *Prog. Brain Res.* **63**:97-106.
- [121] White, R.J.; Reynolds, I.J. (1995) Mitochondrial and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* **15**:2:1318-1328.



## 3. - Marco de la tesis y objetivos

---

<b>3.1. - Marco de la tesis y objetivos</b>	<b>79</b>
3.1.1. - <i>Marco en el que se desarrolla esta tesis doctoral</i>	79
3.1.2. - <i>Objetivos</i>	80





### 3. - Marco de la tesis y objetivos

#### 3.1. - Marco de la tesis y objetivos

##### *3.1.1. - Marco en el que se desarrolla esta tesis doctoral*

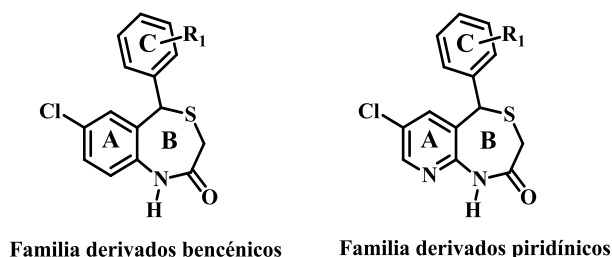
Esta memoria que se presenta para obtener el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid se enmarca en el desarrollo de nuevos fármacos neuroprotectores para tratar enfermedades neurodegenerativas. Se describe una nueva familia de derivados de la benzotiazepina **CGP37157**, tomada como cabeza de serie por su efecto bloqueante del mNCX.

La presente tesis doctoral se ha desarrollado en el Instituto Teófilo Hernando de I+D del Medicamento (ITH) de la Universidad Autónoma de Madrid. El ITH ha cultivado a lo largo de los últimos 30 años una sólida línea en el campo de la comunicación interneuronal y de los mecanismos de muerte neuronal por apoptosis y necrosis, procesos regulados por el ion  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  se haya involucrado en muchos procesos de regulación celular. En base a estas investigaciones, se han abierto nuevas líneas experimentales en el ITH relacionadas con la búsqueda de nuevos compuestos neuroprotectores que se han sintetizado en la Unidad de Química Médica del ITH. Esta tesis es una continuación de la investigación realizada por el Dr. Santos M. Nicolau, bajo la dirección del Dr. Antonio G. García, que estudió la hipótesis del estudio del mNCX como una nueva diana para neuroprotección.

En la presente memoria está basada principalmente en la línea de investigación del ITH, síntesis y evaluación de nuevos derivados de **CGP37157** como agentes reguladores del  $\text{Ca}^{2+}$ . La aportación original de este trabajo de investigación es el diseño y síntesis de nuevos derivados de **CGP37157** que tengan por diana terapéutica el mNCX. De esta forma se puede ejercer un efecto

modulador de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y efecto neuroprotector, y rescatar de la muerte a las neuronas vulnerables en enfermedades neurodegenerativas. Teniendo en cuenta estas directrices, hemos propuesto sintetizar una primera familia de derivados de **CGP37157** basada en cambios de la sustitución en el anillo C de la molécula. Así, se ha propuesto introducir como sustituyentes halógenos, alquilos y alcóidos, para mejorar la selectividad de estos compuestos por el mNCX, aumentando el volumen estérico de los sustituyentes, que proporcionaría derivados con mayor discriminación conformacional. Mayoritariamente, esta modificación del sustituyente se ha realizado en la posición 2', aunque también se ha abordado la introducción de sustituyentes en otras dos posiciones.

Pensando en una mejora de las propiedades farmacocinéticas de los compuestos, en base a la conocida baja solubilidad de **CGP37157**<sup>[83]</sup>, una vez realizados estos derivados, se propuso la síntesis de análogos derivados de piridina como anillo fusionado al sistema de tiazepina. Al sustituir el benzoderivado por piridoderivado, se consiguen compuestos más polares y susceptible de formar sales solubles. Así pues, las familias de los compuestos que hemos propuesto sintetizar se esquematizan en la siguiente figura;



**Figura 15.** - Familias de derivados de **CGP37157**.

### 3.1.2. - Objetivos

Los objetivos se pueden enmarcar en los siguientes puntos:

- Establecer un diseño de síntesis química eficaz, rápida, viable, con altos rendimientos y sintéticamente económica que nos permita obtener derivados del compuesto cabeza de serie **CGP37157**.
- Evaluación del perfil neuroprotector de los nuevos derivados sintetizados en diferentes modelos experimentales, para poder determinar su perfil neuroprotector frente a diferentes estímulos tóxicos relacionadas con neurodegeneración.
- Evaluación del efecto bloqueante de los nuevos derivados sintetizados sobre el mNCX en mitocondrias intactas o "*in situ*", y análisis de su selectividad de acción.



## 4. - Procedimiento experimental

---

<b>4.1. - Materiales de síntesis y métodos de caracterización</b>	<b>87</b>
4.1.1. - <i>Materiales utilizados</i>	87
4.1.2. - <i>Métodos experimentales de caracterización estructural</i>	87
4.1.2.1. <u>Análisis elemental y puntos de fusión</u>	87
4.1.2.2. <u>Espectroscopía de infrarrojos</u>	88
4.1.2.3. <u>Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear</u>	88
4.1.2.4. <u>Espectrometría de Masas</u>	89
<b>4.2. - Síntesis de 4,1-benzotiazepinas y 4,1-piridotiazepinas análogas a CGP37157</b>	<b>89</b>
4.2.1. - <i>Síntesis de intermedios de partida</i>	89
4.2.1.1. <u>Síntesis de 2-isopropilbenzaldehído (1)</u>	89
4.2.1.2. <u>Síntesis de 4-cloro-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (2)</u>	90
4.2.1.3. <u>Síntesis de <i>N</i>-(cloropiridín-2-il)pivaloamida (3)</u>	90
4.2.2. - <i>Síntesis 4,1-benzotiazepinas análogas a CGP37157</i>	91
4.2.2.1. - <i>Procedimiento general para la síntesis de 4-cloro-2-[hidroxi(aril)metil]-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (4-14)</i>	91
4.2.2.1.i. <u>4-cloro-2-[hidroxi(2'-metilfenil)metil]-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (4)</u>	92
4.2.2.1.ii. <u>4-cloro-2-[hidroxi(2'-bromofenil)metil]-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (5)</u>	92
4.2.2.1.iii. <u>4-cloro-2-[hidroxi(2'-clorofenil)metil]-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (6)</u>	92
4.2.2.1.iv. <u>4-cloro-2-[hidroxi(2'-trifluorometilfenil)metil]-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (7)</u>	93
4.2.2.1.v. <u>4-cloro-2-[hidroxi(2',6'-diclorofenil)metil]-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (8)</u>	93
4.2.2.1.vi. <u>4-cloro-2-[hidroxi(2'-metoxifenil)metil]-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (9)</u>	93
4.2.2.1.vii. <u>4-cloro-2-[hidroxi(4'-metoxifenil)metil]-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (10)</u>	94
4.2.2.1.viii. <u>4-cloro-2-[hidroxi(fenil)metil]-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (11)</u>	94
4.2.2.1.ix. <u>4-cloro-2-[hidroxi(2'-isopropilfenil)metil]-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (12)</u>	94
4.2.2.1.x. <u>4-cloro-2-[hidroxi(4'-fluorofenil)metil]-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (13)</u>	95
4.2.2.1.xi. <u>4-cloro-2-[hidroxi(2'-etoxifenil)metil]-<i>N</i>-tert-butoxicarbonilanilina (14)</u>	95

4.2.2.2. - Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-( <i>aril</i> )-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3 <i>H</i> )-ona (15-25)	95
4.2.2.2.i. 7-cloro-5-(2'-metilfenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3 <i>H</i> )-ona (15)	96
4.2.2.2.ii. 7-cloro-5-(2'-bromofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3 <i>H</i> )-ona (16)	96
4.2.2.2.iii. 7-cloro-5-(2'-clorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3 <i>H</i> )-ona (17)	97
4.2.2.2.iv. 7-cloro-5-(2'-trifluorometilfenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3 <i>H</i> )-ona (18)	97
4.2.2.2.v. 7-cloro-5-(2',6'-diclorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3 <i>H</i> )-ona (19)	98
4.2.2.2.vi. 7-cloro-5-(2'-metoxifenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3 <i>H</i> )-ona (20)	98
4.2.2.2.vii. 7-cloro-5-(4'-metoxifenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3 <i>H</i> )-ona (21)	99
4.2.2.2.viii. 7-cloro-5-fenil-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3 <i>H</i> )-ona (22)	99
4.2.2.2.ix. 7-cloro-5-(2'-isopropilfenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3 <i>H</i> )-ona (23)	100
4.2.2.2.x. 7-cloro-5-(4'-fluorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3 <i>H</i> )-ona (24)	100
4.2.2.2.xi. 7-cloro-5-(2'-etoxifenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3 <i>H</i> )-ona (25)	101
4.2.3. - Síntesis 4,1-piridotiazepinas análogas a CGP37157	101
4.2.3.1. - Procedimiento general para la síntesis de <i>N</i> -(5-cloro-3-[hidroxi( <i>aril</i> )piridín-2-il]pivaloamida (26-36)	101
4.2.3.1.i. <i>N</i> -(5-cloro-3-[hidroxi(2'-trifluorometilfenil)piridín-2-il]pivaloamida (26)	102
4.2.3.1.ii. <i>N</i> -(5-cloro-3-[hidroxi(2'-metoxifenil)piridín-2-il]pivaloamida (27)	102
4.2.3.1.iii. <i>N</i> -(5-cloro-3-[hidroxi(2'-metilfenil)piridín-2-il]pivaloamida (28)	103
4.2.3.1.iv. <i>N</i> -(5-cloro-3-[hidroxi(4'-metoxifenil)piridín-2-il]pivaloamida (29)	103
4.2.3.1.v. <i>N</i> -(5-cloro-3-[hidroxi(2'-etoxifenil)piridín-2-il]pivaloamida (30)	103
4.2.3.1.vi. <i>N</i> -(5-cloro-3-[hidroxi(fenil)piridín-2-il]pivaloamida (31)	103
4.2.3.1.vii. <i>N</i> -(5-cloro-3-[hidroxi(4'-fluorofenil)piridín-2-il]pivaloamida (32)	104
4.2.3.1.viii. <i>N</i> -(5-cloro-3-[hidroxi(2'-isopropilfenil)piridín-2-il]pivaloamida (33)	104
4.2.3.1.ix. <i>N</i> -(5-cloro-3-[hidroxi(2'-clorofenil)piridín-2-il]pivaloamida (34)	104
4.2.3.1.x. <i>N</i> -(5-cloro-3-[hidroxi(2'-bromofenil)piridín-2-il]pivaloamida (35)	105
4.2.3.1.xi. <i>N</i> -(5-cloro-3-[hidroxi(2',6'-diclorofenil)piridín-2-il]pivaloamida (36)	105
4.2.3.2. - Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridín-3-il)( <i>aril</i> )metanol (37-47)	105
4.2.3.2.i. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-trifluorometilfenil)metanol (37)	106
4.2.3.2.ii. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-metoxifenil)metanol (38)	106
4.2.3.2.iii. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-metilfenil)metanol (39)	106
4.2.3.2.iv. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(4'-metoxifenil)metanol (40)	106
4.2.3.2.v. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-etoxifenil)metanol (41)	107
4.2.3.2.vi. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(fenil)metanol (42)	107

<u>4.2.3.2.vii. 4 (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(4'-fluorofenil)metanol (43)</u>	107
<u>4.2.3.2.viii. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-isopropilfenil)metanol (44)</u>	108
<u>4.2.3.2.ix. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-clorofenil)metanol (45)</u>	108
<u>4.2.3.2.x. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-bromofenil)metanol (46)</u>	108
<u>4.2.3.2.xi. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2',6'-diclorofenil)metanol (47)</u>	109
 <i>4.2.3.3. - Procedimiento general para la síntesis de 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(aril)metiltio)acetato de metilo (48-58)</i>	109
<u>4.2.3.3.i. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-trifluorometilfenil)metiltio)acetato de metilo (48)</u>	110
<u>4.2.3.3.ii. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-metoxifenil)metiltio)acetato de metilo (49)</u>	110
<u>4.2.3.3.iii. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-metilfenil)metiltio)acetato de metilo (50)</u>	110
<u>4.2.3.3.iv. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(4'-metoxifenil)metiltio)acetato de metilo (51)</u>	111
<u>4.2.3.3.v. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-etoxifenil)metiltio)acetato de metilo (52)</u>	111
<u>4.2.3.3.vi. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(fenil)metiltio)acetato de metilo (53)</u>	111
<u>4.2.3.3.vii. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(4'-fluorofenil)metiltio)acetato de metilo (54)</u>	112
<u>4.2.3.3.viii. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-isopropilfenil)metiltio)acetato de metilo (55)</u>	112
<u>4.2.3.3.ix. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-clorofenil)metiltio)acetato de metilo (56)</u>	112
<u>4.2.3.3.x. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-bromofenil)metiltio)acetato de metilo (57)</u>	113
<u>4.2.3.3.xi. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2',6'-diclorofenil)metiltio)acetato de metilo (58)</u>	113
 <i>4.2.3.4. - Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-(aril)-3,5-dihidropirido [2,3-e] [4,1]tiazepin-2(1H)-ona (59-69)</i>	113
<u>4.2.3.4.i. 7-cloro-5-(2'-trifluorometilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (59)</u>	114
<u>4.2.3.4.ii. 7-cloro-5-(2'-metoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (60)</u>	114
<u>4.2.3.4.iii. 7-cloro-5-(2'-metilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (61)</u>	115
<u>4.2.3.4.iv. 7-cloro-5-(4'-metoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (62)</u>	115
<u>4.2.3.4.v. 7-cloro-5-(2'-etoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (63)</u>	116
<u>4.2.3.4.vi. 7-cloro-5-fenil-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (64)</u>	116
<u>4.2.3.4.vii. 7-cloro-5-(4'-fluorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (65)</u>	117
<u>4.2.3.4.viii. 7-cloro-5-(2'-isopropilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (66)</u>	117
<u>4.2.3.4.ix. 7-cloro-5-(2'-clorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (67)</u>	118
<u>4.2.3.4.x. 7-cloro-5-(2'-bromofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (68)</u>	118
<u>4.2.3.4.xi. 7-cloro-5-(2',6'-diclorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (69)</u>	119

### 4.3. - Materiales y métodos de evaluación farmacológica 119

4.3.1. - <i>Materiales utilizados</i>	119
4.3.2. - <i>Líneas celulares utilizadas</i>	120
4.3.2.1. - <u>Células SH-SY5Y</u>	120
4.3.2.2. - <u>Células HeLa</u>	121
4.3.3. - <i>Cultivo primario de células cromafín bovinas</i>	121
4.3.4. - <i>Preparación de rodajas de hipocampo de rata</i>	122
4.3.5. - <i>Determinación de la viabilidad celular mediante MTT</i>	123
4.3.6. - <i>Determinación de la viabilidad celular mediante LDH</i>	124
 <b>4.4. - Evaluación del perfil neuroprotector de los derivados de CGP37157</b>	 <b>125</b>
4.4.1. - <i>Evaluación del perfil neuroprotector frente a veratridina</i>	125
4.4.2. - <i>Evaluación del perfil neuroprotector frente a 70 mM de K<sup>+</sup></i>	126
4.4.3. - <i>Evaluación en rodajas de hipocampo de rata frente a glutamato</i>	127
4.4.4. - <i>Evaluación del perfil neuroprotector frente a estrés oxidativo</i>	127
 <b>4.5. - Evaluación de los derivados de CGP37157 como bloqueantes del mNCX</b>	 <b>128</b>
4.5.1. - <i>Procedimiento experimental para la expresión y reconstitución de la AEQ en las células HeLa</i>	130
4.5.2. - <i>Evaluación de los compuestos en células HeLa intactas</i>	131
4.5.3. - <i>Evaluación de los compuestos frente al bloqueo del mNCX en mitocondrias "in situ"</i>	132
 <b>4.6. - Análisis estadístico</b>	 <b>135</b>
 <b>4.7. - Bibliografía</b>	 <b>136</b>



## 4. - Procedimiento experimental

### 4.1. - Materiales de síntesis y métodos de caracterización

#### 4.1.1. - Materiales utilizados

Los reactivos de partida comerciales se han utilizado sin previa purificación. 4-cloroanilina, 5-cloro-2-aminopiridina, dicarbonato de di-*tert*-butilo ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ), cloruro de pivaloilo, *tert*-butillitio ( $t\text{BuLi}$ ), *n*-butillitio ( $n\text{-BuLi}$ ), tioglicolato de metilo y los aldehídos correspondientes para cada derivado bencénico y piridínico sintetizado, fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). El ácido trifluoroacético (TFA) fue suministrado por VWR (Barcelona, España). Los disolventes utilizados para extracción y cromatografía fueron suministrados por Carlo Erba (Barcelona, España) y VWR en calidad analítica. Todas las reacciones descritas en esta memoria se llevaron a cabo bajo las condiciones de Schlenk<sup>[122]</sup> (sistema purgado previamente con ciclos de vacío/gas inerte). Los disolventes utilizados en las reacciones son destilados sobre adsorbente justo antes de su utilización bajo argón<sup>[123]</sup>. Los disolventes de elección para la caracterización por resonancia magnética nuclear (RMN) son cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) y dimetilsulfóxido deuterado ( $\text{DMSO-d}_6$ ) y fueron suministrados por Carlo-Erba.

#### 4.1.2. - Métodos experimentales de caracterización estructural

##### 4.1.2.1. Análisis elemental y puntos de fusión

<sup>122</sup> Tidwell, T.T. (2001) Wilhelm Schlenk: The Man Behind the Flask. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**:331-337.

<sup>123</sup> Armarego, W.L.F.; Chai, C.L.L. (2009) Purification of Laboratory Chemicals, *Pergamon Press*: Oxford.

Los análisis elementales de C, H, N y S se han realizado en un analizador *LECO CHNS-932*. Estos análisis se realizaron en la Unidad de Análisis Elemental del Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la Universidad Autónoma de Madrid. Los puntos de fusión se midieron en un aparato *Melting Point Modelo SMP10* de Stuart y están sin corregir.

#### 4.1.2.2. Espectroscopía de Infrarrojos

Los espectros vibracionales de FTIR entre 4000 y 500  $\text{cm}^{-1}$  han sido registrados en un espectrofotómetro *FTIR Bruker Serie IFS66v*, empleando pastillas de bromuro potásico (KBr) para su realización. Estos análisis se realizaron en la Unidad de Espectroscopía Molecular, Laboratorio de Espectroscopía de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FTIR) del SIdI de la Universidad Autónoma de Madrid.

#### 4.1.2.3. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN fueron registrados en un espectrofotómetro *BRUKER AVANCE III-HD NANOBAV 300MHz* equipado con una sonda multinuclear inversa de 5 mm, utilizando  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{DMSO}_{\text{d}6}$  como disolventes. La asignación de las señales se realiza sobre la base de los desplazamientos químicos, el valor de integración de las señales, su multiplicidad y el valor de las constantes de acoplamiento espín-espín. Los valores de los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se dan en unidades ppm, y los valores de las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Herzios (Hz). Las referencias de los espectros de resonancia de los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  son los picos residuales de moléculas no deuteradas del disolvente deuterado. Estos análisis se realizaron por nuestro grupo en el autoservicio de la Unidad de Espectroscopía Molecular, Laboratorio Jesús H. Rodríguez Ramos, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear de Líquidos del SIdI de la Universidad Autónoma de Madrid.

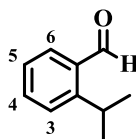
#### 4.1.2.4. Espectrometría de Masas

Los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro *VG AutoSpec Waters* en un QSTAR (Applied Biosystems) para electrospray (ESI). Los datos obtenidos vienen expresados en unidades de relación masa/carga ( $m/z$ ) y el valor entre paréntesis indica la intensidad relativa de la señal frente al pico base (100%). Estos análisis se realizaron en la Unidad de Espectrometría de Masas, Laboratorio de Espectrometría de Masas del SIdI de la Universidad Autónoma de Madrid.

### 4.2. - Síntesis de 4,1-benzotiazepinas y 4,1-piridotiazepinas análogas a CGP37157

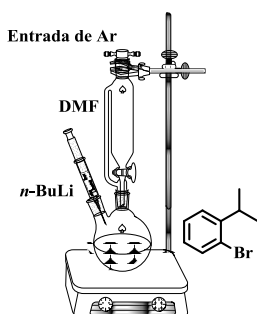
#### 4.2.1. - Síntesis de intermedios de partida

##### 4.2.1.1. Síntesis de 2-isopropilbenzaldehído (**1**)



(**1**)

El aldehído (**1**) que ha sido utilizado para la síntesis de **12** y **33** no es comercial, por lo que es preparado en el laboratorio.

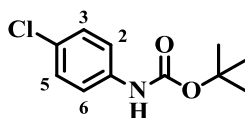


2-isopropilbromobenceno (2,51 mmol, 500 mg) disuelto en tetrahidrofurano (THF), se enfría a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  bajo atmosfera de Ar. *n*-BuLi (2,5 M en hexano, 2,76 mmol, 177 mg) es añadido gota a gota, después de lo cual la solución se deja a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min para posteriormente añadir dimetilformamida anhidro (DMF) (2,76 mmol, 200 mg) gota a gota. La reacción se deja agitar a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 min. La reacción se permite calentar hasta  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,

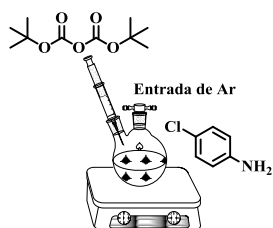
monitorizándola por TLC hasta la desaparición del sustrato. La reacción se interrumpe añadiendo H<sub>2</sub>O (50 ml). Se extrae con éter dietílico (Et<sub>2</sub>O) (3 × 75 ml). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub>, se filtra y se elimina el disolvente, obteniendo un aceite incoloro (368 mg, 99%).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 10,3 (s, 1H, CHO), 7,79 (d, <sup>3</sup>J = 8,6 Hz, 1H, H6), 7,59 (t, <sup>3</sup>J = 8,6 Hz, 1H, H4), 7,43 (t, <sup>3</sup>J = 8,6 Hz, 1H, H4), 7,29 (d, <sup>3</sup>J = 8,6 Hz, 1H, H5), 3,95 (hp, 1H, <sup>3</sup>J = 7,5 Hz, CH), 1,27 (d, 6H, <sup>3</sup>J = 7,5 CH<sub>3</sub>).

#### 4.2.1.2. Síntesis de 4-cloro-*N*-tert-butoxicarbonilanilina (2)



(2)



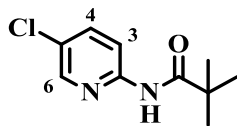
A una solución de 4-cloroanilina (78,4 mmol, 10 g) en THF recién destilado (65 ml), se añade Boc<sub>2</sub>O (86,2 mmol, 18,8 g) y trietilamina (Et<sub>3</sub>N) (86,2 mmol, 8,7 g) bajo atmósfera de Ar. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 48 h. Se elimina el

disolvente a vacío y se añade acetato de etilo (AcOEt) (300 ml), se lava con una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (2 × 100 ml) y posteriormente con H<sub>2</sub>O (2 × 100 ml), la fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y se elimina el disolvente obteniendo un sólido blanco (16,4 g, 92%).

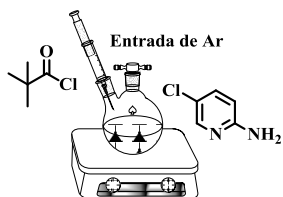
Pto. Fusión: 100 - 101 °C.

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm)=7,31 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8,6 Hz, H2, H6), 7,24 (d, 2H, <sup>3</sup>J = 8,6 Hz, H3, H5), 6,47 (bs, 1H, NH), 1,51 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

#### 4.2.1.3. Síntesis de *N*-(cloropiridín-2-il)pivaloamida (3)



(3)



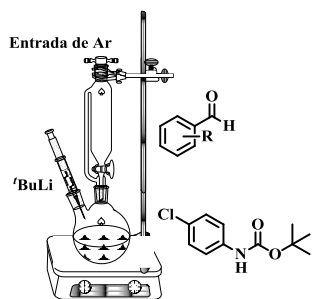
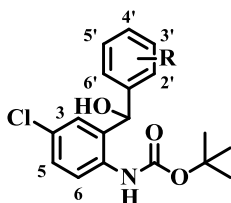
A una solución de 2-amino-5-cloropiridina (50,0 mmol, 6,4 g) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  recién destilado (75 ml), se añade  $\text{Et}_3\text{N}$  (62,5 mmol, 6,3 g) lentamente bajo atmósfera de Ar, después de lo cual la reacción se enfría a 0 °C y se añade cloruro de pivaloilo (55,0 mmol, 6,6 g) en 10 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La mezcla de reacción se agita a 0 °C durante 15 min y a temperatura ambiente durante 3 h, monitorizando la reacción cada 30 min por TLC. Transcurrido este tiempo, añadimos  $\text{H}_2\text{O}$  (50 ml), se lava la fase orgánica con solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$  al 10% ( $3 \times 50$  ml); la fase orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se elimina el disolvente, obteniendo un aceite incoloro que precipita a sólido blanco en congelador (10,4 g, 98%).

Pto. Fusión: 63 - 64 °C.

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,20 (d, 1H,  $^3J = 8,8$  Hz, H3), 8,17 (bs, 1H, NH), 8,13 (d,  $^4J = 2,6$  Hz, H6, 1H), 7,62 (dd, 1H,  $^3J = 8,8$  /  $^4J = 2,6$  Hz, H4), 1.26 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ).

#### 4.2.3. - Síntesis 4,1-benzotiazepinas análogas a **CGP37157**

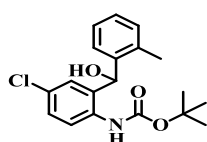
##### 4.2.3.1.- Procedimiento general para la síntesis de 4-cloro-2-[hidroxi(aril)metil]-N-tert-butoxicarbonil-anilina (**4-14**)



Al compuesto **2** (1 equiv) disuelto en THF recién destilado (15 ml) se le añade, gota a gota, una solución de  $t\text{BuLi}$  (1,7 M en hexano, 2,7 equiv) a -78 °C bajo atmósfera de Ar. Se deja 15 minutos a -78 °C y posteriormente se sube la temperatura a -20 °C manteniéndola durante 2 h. El arilaldehído correspondiente (1,1 equiv) disuelto en THF recién destilado (5 ml) se añade, gota a gota, a -78 °C y se deja agitar a esta

temperatura durante 2 h monitorizando por TLC la evolución de la reacción. Cuando la reacción no evoluciona más, se añade H<sub>2</sub>O (15 ml) permitiendo que la reacción alcance la temperatura ambiente. Se extrae con Et<sub>2</sub>O (3 × 30 ml) y la fase orgánica combinada se lava con salmuera (3 × 50 ml). La fase orgánica se seca con MgSO<sub>4</sub>, se filtra y se elimina el disolvente obteniéndose un aceite amarillo que se purifica mediante columna cromatográfica automatizada utilizando como eluyente mezclas de AcOEt:Hexano.

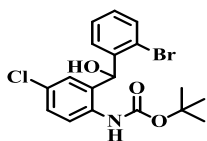
#### 4.2.2.1.i. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-metilfenil)metil]-*N*-tert-butoxicarbonil-anilina (**4**)



Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **2** (2,18 mmol, 500 mg) con 2-metilbenzaldehído (2,39 mmol, 287 mg), da lugar a **4** con un rendimiento del 68% (515,6 mg).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7,69 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 9,3 Hz, H<sub>6</sub>), 7,49 (m, 2H, H<sub>aromáticos</sub>), 7,30-7,18 (m, 4H, H<sub>aromáticos</sub>), 6,80 (s, 1H, NH), 6,01 (d, 1H, <sup>4</sup>*J* = 4,0 Hz, CH), 2,68 (d, 1H, <sup>4</sup>*J* = 4,1 Hz, OH), 2,19 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) 1,41 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

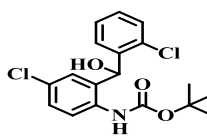
#### 4.2.2.1.ii. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-bromofenil)metil]-*N*-tert-butoxicarbonil-anilina (**5**)



Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **2** (2,18 mmol, 500 mg) con 2-bromobenzaldehído (2,39 mmol, 442 mg), da lugar a **5** con un rendimiento de 65% (584,8 mg).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 7,79 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8,6 Hz, H<sub>6</sub>), 7,59 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8,6 Hz, H<sub>5</sub>), 7,33-7,21 (m, 5H, H<sub>aromáticos</sub>), 6,83 (bs, 1H, NH), 6,15 (s, 1H, CH), 3,82 (s, 1H, OH), 1,41 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

#### 4.2.2.1.iii. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-clorofenil)metil]-*N*-tert-butoxicarbonil-anilina (**6**)

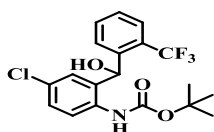


Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **2** (2,18 mmol, 500 mg) con 2-clorobenzaldehído (2,39 mmol, 336 mg), da lugar a **6** con un rendimiento de 61% (489,7 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,69 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H6), 7,52 (dd, 1H  $^3J = 8,6$  /  $^4J = 2,3$  Hz, H5) 7,47 (bs, 1H, NH), 7,33-7,21 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 6,90 (d, 1H,  $^4J = 2,3$  Hz, H3), 6,15 (s, 1H, CH), 3,72 (s, 1H, OH), 1,41 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ).

#### 4.2.2.1.iv. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-trifluorometilfenil)metil]-*N*-tert-butoxicarbonilanilina

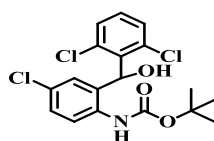
(7)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **2** (2,18 mmol, 500 mg) con 2-trifluorometilbenzaldehído (2,39 mmol, 416 mg), da lugar a **7** con un rendimiento de 65% (569,4 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 7,70 (d, 2H,  $^3J = 7,7$  Hz,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 7,60 (t, 1H,  $^3J = 7,7$  Hz, H5'), 7,40 (t, 1H,  $^3J = 7,7$  Hz, H4'), 7,23 (s, 1H, NH), 7,24 (d, 1H,  $^3J = 7,7$  Hz, H3'), 6,90 (d, 1H,  $^4J = 2,3$  Hz, H3), 6,23 (s, 1H, CH), 3,63 (s, 1H, OH), 1,41 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ).

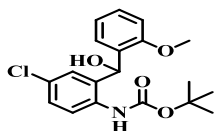
#### 4.2.2.1.v. 4-cloro-2-[hidroxi(2',6'-diclorofenil)metil]-*N*-tert-butoxicarbonilanilina (**8**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **2** (2,18 mmol, 500 mg) con 2,6-diclorobenzaldehído (2,39 mmol, 418 mg), da lugar a **8** con un rendimiento de 64% (561,9 mg).

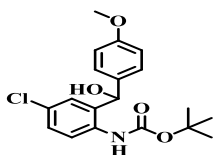
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,33 (s, 1H, NH), 8,03 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H6), 7,40 (d, 2H,  $^3J = 8,6$  Hz, H3, H5), 7,30-7,20 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 6,50 (s, 1H, CH), 3,93 (s, 1H, OH), 1,41 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ).

#### 4.2.2.1.vi. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-metoxifenil)metil]-*N*-tert-butoxicarbonilanilina (**9**)



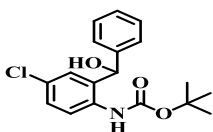
Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **2** (2,18 mmol, 500 mg) con 2-metoxibenzaldehído (2,39 mmol, 325 mg), da lugar a **9** con un rendimiento de 68% (539,4 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,10 (s, 1H, NH), 7,89 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H6), 7,40-7,20 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 7,00-6,87 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 6,10 (s, 1H, CH), 3,90 (bs, 1H, OH), 3,81 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 1,41 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ).

4.2.2.1.vii. 4-cloro-2-[hidroxi(4'-metoxifenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilanilina (**10**)

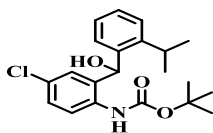
Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **2** (2,18 mmol, 500 mg) con 4-metoxibenzaldehído (2,39 mmol, 325 mg), da lugar a **10** con un rendimiento de 63% (499,7 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,80 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H6), 7,53 (s, 1H, NH), 7,25 (d, 2H,  $^3J = 7,7$  Hz, H2'/H6'), 7,00 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H5), 6,92 (d, 2H,  $^3J = 7,7$  Hz, H3'/H5'), 5,83 (s, 1H, CH), 3,83 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2,60 (s, 1H, OH), 1,41 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ).

4.2.2.1.viii. 4-cloro-2-[hidroxifenilmetil]-N-tert-butoxicarbonilanilina (**11**)

Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **2** (2,18 mmol, 500 mg) con benzaldehído (2,39 mmol, 253 mg), da lugar a **11** con un rendimiento de 62% (451,2 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,80 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H6), 7,52 (s, 1H, NH), 7,40-7,20 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 7,10 (dd, 1H,  $^3J = 8,6$  /  $^4J = 2,3$  Hz, H5), 7,00 (d, 1H,  $^4J = 2,3$  Hz, H3), 5,80 (s, 1H, CH), 2,90 (s, 1H, OH), 1,41 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ).

4.2.2.1.ix. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-isopropilfenil)metil]-N-tert-butoxicarbonilanilina (**12**)

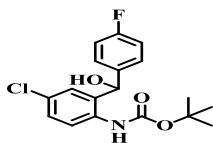
Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **2** (2,18 mmol, 500 mg) con 2-isopropilbenzaldehído (**1**) (2,39 mmol, 354 mg), da lugar a **12** con un rendimiento de 67%

(549,0 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,80 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H6), 7,42 (s, 1H, NH), 7,38-7,10 (m, 6H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 6,90 (d, 1H,  $^4J = 2,3$  Hz, H3), 6,10 (s, 1H, CH), 3,00 (hp, 1H  $^3J = 7,0$  Hz, CH), 2,45 (s, 1H, OH), 1,41 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ), 1,23 (d, 3H,  $^3J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,18 ppm (d, 3H,  $^3J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).



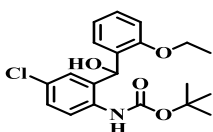
#### 4.2.2.1.x. 4-cloro-2-[hidroxi(4'-fluorofenil)metil]-*N*-tert-butoxicarbonil-anilina (**13**)



Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **2** (2,18 mmol, 500 mg) con 4-fluorobenzaldehído (2,39 mmol, 296 mg), da lugar a **13** con un rendimiento de 63% (483,2 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,80 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H6), 7,41 (s, 1H, NH), 7,38-7,20 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 7,00 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 5,83 (s, 1H, CH), 2,90 (s, 1H, OH), 1,41 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ).

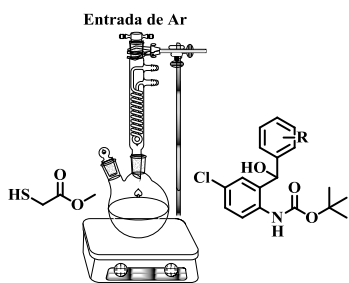
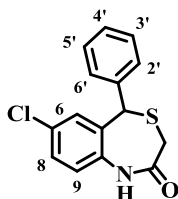
#### 4.2.2.1.xi. 4-cloro-2-[hidroxi(2'-etoxifenil)metil]-*N*-tert-butoxicarbonil-anilina (**14**)



Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **2** (2,18 mmol, 500 mg) con 2-etoxibenzaldehído (2,39 mmol, 358 mg), da lugar a **14** con un rendimiento de 67% (551,9 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,98 (s, 1H, NH), 7,89 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H6), 7,30-7,20 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 7,10 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H5), 6,99-6,80 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 6,10 (s, 1H, CH), 4,12 (c, 2H  $^3J = 7,0$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 3,45 (s, 1H, OH), 1,41 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ), 1,35 (t, 3H,  $^3J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

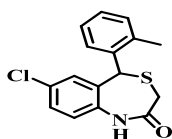
#### 4.2.2.2 Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-(aril)-1,5-dihidro-4*H*-benzotiazepin-2(3*H*)-ona (**5-15**)



A los intermedios **4-14** (1 equiv) se añade una mezcla de tioglicolato de metilo (6 equiv) y TFA (14 equiv) bajo atmósfera de Ar. La mezcla es agitada a 85 °C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se disuelve en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml), se lava con salmuera (30 ml), NaOH 1N (30 ml) y otra vez salmuera (30 ml). La fase orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtra y se

elimina el disolvente. Cuando es necesario, el crudo de reacción es sometido a purificación mediante columna cromatográfica automatizada utilizando como eluyente mezclas de AcOEt:Hexano.

#### 4.2.2.2.i. 7-cloro-5-(2'-metilfenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (**15**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **4** (0,28 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,68 mmol, 154 mg) da lugar a **15** con un rendimiento del 58% (49,3 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{16}H_{14}ClNOS$ : C: 63,25%; H: 4,64%; N: 4,61%; S: 10,55%; Encontrado: C: 62,63%; H: 4,77%; N: 4,43%; S: 10,44%.

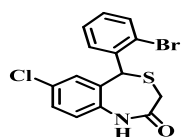
Pto. Fusión: 213 - 215 °C.

API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 304,0 (100%);  $[M+Na]^+$ : 326,05 (24,1%);  $[2M+H]^+$ : 607,9 (9,21%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,73 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H9), 7,50 (s, 1H, NH), 7,40-7,20 (m, 4H,  $H_{aromáticos}$ ), 7,04 (dd, 1H,  $^3J = 8,6$  /  $^4J = 3,4$  Hz, H8), 6,75 (d, 1H,  $^4J = 3,4$  Hz, H6), 5,90 (s, 1H, CH), 3,33 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,00 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 2,06 (s, 3H,  $CH_3$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 18,7; 36,3; 44,4; 111,3; 126,1; 126,2; 126,5; 128,1; 128,2; 128,8; 130,4; 130,9; 134,6; 136,0; 143,6; 168,8.

#### 4.2.2.2.ii. 7-cloro-5-(2'-bromofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (**16**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **5** (0,24 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,44 mmol, 132 mg) da lugar a **16** con un rendimiento del 57% (50,4 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{15}H_{11}BrClNOS$ : C: 48,87%; H: 3,01%; N: 3,80%; S: 8,70%; Encontrado: C: 48,49%; H: 3,24%; N: 3,69%; S: 8,58%.

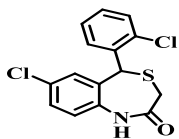
Pto. Fusión: 204 - 206 °C.

API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 369,95 (100%);  $[M+Na]^+$ : 391,92 (3,2%);  $[2M+H]^+$ : 736,89 (22,9%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 9,03 (s, 1H, NH), 7,77 (dd, 1H,  $^3J = 8,6$  /  $^4J = 1,6$  Hz, H8), 7,55 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H9), 7,43 (dt, 1H,  $^3J = 7,6$  /  $^4J = 0,7$  Hz, H4'), 7,22 (m, 2H,  $H_{aromáticos}$ ), 7,09 (d, 1H,  $^3J = 8,2$  Hz, H3'), 6,64 (d, 1H,  $^3J = 2,5$  Hz, H6), 6,11 (s, 1H, CH), 3,33 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,00 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 30,9; 45,7; 124,5; 124,6; 127,4; 127,6; 128,3; 129,6; 130,6; 132,9; 133,2; 134,2; 135,1; 135,2; 168,8.

#### 4.2.2.2.iii. 7-cloro-5-(2'-clorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (**17**)



Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **6** (0,27 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,62 mmol, 149 mg) da lugar a **17** con un rendimiento del 57% (49,9 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{15}H_{11}Cl_2NOS$ : C: 55,57%; H: 3,42%; N: 4,32%; S: 9,89%; Encontrado: C: 55,18%; H: 3,61%; N: 4,19%; S: 9,89%.

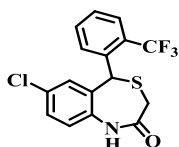
Pto. Fusión: 218 - 220 °C.

API-ES(m/z):  $[M+H^+]$ : 324,00 (100%);  $[M+Na^+]$ : 345,98 (8,2%);  $[2M+H^+]$ : 648,99 (47,3%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,67 (s, 1H, NH), 7,81 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H9), 7,43-7,29 (m, 3H,  $H_{aromáticos}$ ), 7,21 (dd, 1H,  $^3J = 8,6$  /  $^4J = 2,3$  Hz, H8), 7,08 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H3'), 6,69 (d, 1H,  $^3J = 2,3$  Hz, H6), 6,13 (s, 1H, CH), 3,33 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,00 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 31,4; 43,6; 125,2; 127,1; 127,9; 128,7; 129,7; 130,3; 130,8; 133,1; 134,0; 134,2; 135,0; 135,3; 170,1.

#### 4.2.2.2.iv. 7-cloro-5-(2'-trifluorometilfenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (**18**)



Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **7** (0,25 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,50 mmol, 138 mg) da lugar a **18** con un rendimiento del 58% (51,9 mg).

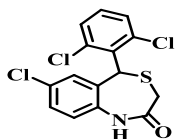
Análisis químico calculado para  $C_{16}H_{11}ClF_3NOS$ : C: 53,71%; H: 3,10%; N: 3,91%; S: 8,96%; Encontrado: C: 53,82%; H: 3,17%; N: 3,83%; S: 8,66%.

Pto. Fusión: 179 - 181 °C.

API-ES (m/z):  $[M+H^+]$ : 358,03 (100%);  $[M+Na^+]$ : 380,01 (7,1%);  $[2M+H^+]$ : 715,05 (67,2%);  $[2M+Na^+]$ : 737,03 (9,2%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,08 (d, 1H,  $^3J = 7,7$  Hz, H9), 8,00 (s, 1H, NH), 7,72 (t, 2H,  $^3J = 7,9$  Hz, H6'/H5'), 7,52 (t, 1H,  $^3J = 7,9$  Hz, H4'), 7,25 (dd, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,6$  Hz, H8), 7,07 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3'), 6,72 (d, 1H,  $^3J = 1,8$  Hz, H6), 6,17 (s, 1H, CH), 3,40 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,00 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 31,7; 42,3; 125,2; 127,0; 127,0; 127,7; 128,7; 128,8; 129,1; 132,0; 132,1; 133,2; 134,2; 134,4; 135,8; 169,2.

4.2.2.2.v. 7-cloro-5-(2',6'-diclorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (19)

Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **8** (0,25 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,50 mmol, 138 mg) da lugar a **19** con un rendimiento del 61% (54,7 mg).

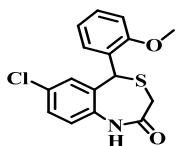
Análisis químico calculado para  $C_{15}H_{10}Cl_3NOS$ : C: 50,23%; H: 2,81%; N: 3,91%; S: 8,94%;  
Encontrado: C: 50,64%; H: 2,51%; N: 3,57%; S: 8,15%.

Pto. Fusión: 208 - 211 °C.

API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 359,67 (100%);  $[M+Na]^+$ : 382,66 (9,5%);  $[2M+H]^+$ : 717,34 (21,9%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,91 (s, 1H, NH), 7,40 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H9), 7,20 (m, 4H,  $H_{aromáticos}$ ), 7,01, (d, 1H,  $^3J = 1,8$  Hz, H6), 6,69 (s, 1H, CH), 3,60 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,00 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 30,9; 45,7; 124,5; 124,6; 127,4; 127,6; 128,3; 129,6; 130,6; 132,9; 133,2; 134,2; 135,1; 135,2; 168,8.

4.2.2.2.vi. 7-cloro-5-(2'-metoxifenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (20)

Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **9** (0,27 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,62 mmol, 149 mg) da lugar a **20** con un rendimiento del 60% (51,8 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{16}H_{14}ClNO_2S$ : C: 58,44%; H: 4,60%; N: 4,26%; S: 10,03%;  
Encontrado: C: 58,11%; H: 4,47%; N: 3,94%; S: 9,22%.

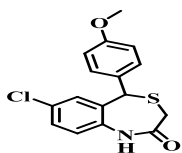
Pto. Fusión: 213 - 215 °C.

API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 320,05 (67,5%);  $[M+Na]^+$ : 342,03 (6,3%);  $[2M+H]^+$ : 639,09 (26,7%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,22 (s, 1H, NH), 7,71 (dd, 1H,  $^3J = 8,6$  /  $^4J = 1,6$  Hz, H8), 7,34 (dt, 1H,  $^3J = 7,6$  /  $^4J = 1,6$  Hz, H4'), 7,32 (dt, 1H,  $^3J = 7,6$  /  $^4J = 1,6$  Hz, H5'), 7,22 (dd, 1H,  $^3J = 8,6$  /  $^4J = 1,6$  Hz, H6'), 7,04 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H9), 6,88 (m, 2H, H3'/H6), 6,14 (s, 1H, CH), 3,66 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3,33 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,00 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 31,6; 40,0; 55,6; 111,1; 120,7; 124,5; 128,3; 128,4; 129,7; 130,5; 133,2; 134,2; 134,9; 136,8; 156,8; 170,1.

4.2.2.2.vii. 7-cloro-5-(4'-metoxifenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (21)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **10** (0,27 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,62 mmol, 149 mg) da lugar a **21** con un rendimiento del 58% (50,1 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{16}H_{14}ClNO_2S$ : C: 58,44%; H: 4,60%; N: 4,26%; S: 10,03%; Encontrado: C: 58,85%; H: 4,43%; N: 3,98%; S: 10,36%.

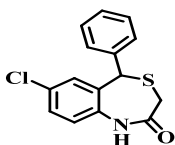
Pto. Fusión: 247 - 249 °C (descompone a 221 °C).

API-ES (m/z):  $[M+H^+]$ : 320,80 (33,6%);  $[M+Na^+]$ : 342,03 (74,5%);  $[2M+H^+]$ : 640,10 (17,4%);  $[2M+Na^+]$ : 661,08 (100%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,66 (s, 1H, NH), 7,46 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz H5',H3'), 7,26 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz H2',H6'), 7,11 (m, 2H, H6/H8), 7,02 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H9), 5,61 (s, 1H, CH), 3,75 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3,30 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,00 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 31,1; 45,6; 55,1; 111,3; 114,1; 114,2; 125,8; 127,4; 128,1; 128,5; 130,2; 130,3; 136,2; 136,4; 159,0; 168,4.

4.2.2.2.viii. 7-cloro-5-fenil-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (22)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **11** (0,30 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,80 mmol, 165 mg) da lugar a **22** con un rendimiento del 59% (52,9 mg).

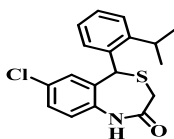
Análisis químico calculado para  $C_{15}H_{12}ClNOS$ : C: 62,17%; H: 4,17%; N: 4,83%; S: 11,07%; Encontrado: C: 61,84%; H: 4,37%; N: 4,49%; S: 11,41%.

Pto. Fusión: 211 - 213 °C.

API-ES (m/z):  $[M+H^+]$ : 290,78 (100%);  $[M+Na^+]$ : 312,77 (23,5%);  $[2M+H^+]$ : 597,56 (7,6%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,52 (s, 1H, NH), 7,42 (m, 6H,  $H_{aromáticos}$ ), 7,02 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H9), 6,96 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 5,65 (s, 1H, CH), 3,31 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,00 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 30,9; 46,3; 111,3; 125,9; 127,7; 128,2; 128,2; 129,0; 129,2; 129,6; 130,2; 136,0; 136,5; 137,1; 168,4.

4.2.2.2.ix. 7-cloro-5-(2'-isopropilfenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (23)

Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **12** (0,27 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,62 mmol, 149 mg) da lugar a **23** con un rendimiento del 62% (55,4 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{18}H_{18}ClNOS$ : C: 65,15%; H: 5,47%; N: 4,22%; S: 9,66%; Encontrado: C: 64,91%; H: 5,53%; N: 4,00%; S: 9,45%.

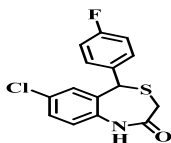
Pto. Fusión: 189 - 190 °C.

API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 332,08 (24,9%);  $[M+Na]^+$ : 355,07 (7,5%);  $[2M+H]^+$ : 663,17 (100%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,73 (dd, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H9), 7,36 (m, 3H, H4'/H5'/H6'), 7,24 (dd, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H8), 7,14 (s, 1H, NH), 7,03 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3'), 6,82 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 6,08 (s, 1H, CH), 3,36 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,00 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 2,81 (hp, 1H,  $^3J = 6,5$  Hz, CH), 1,23 (d, 3H,  $^3J = 6,5$  Hz,  $CH_3$ ), 0,86 (d, 3H,  $^3J = 6,5$  Hz,  $CH_3$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 23,3; 24,0; 28,9; 31,7; 42,6; 124,9; 126,0; 126,4; 128,5; 128,8; 129,0; 129,6; 132,6; 133,1; 134,6; 136,5; 147,0; 170,4.

FTIR (KBr):  $\nu_{NH(st)}=3433,8$   $cm^{-1}$ ,  $\nu_{CHaromáticos(st)}=3085,4$   $cm^{-1}$ ,  $\nu_{CHalifáticos(st)}=2927,4$   $cm^{-1}$ ,  $\nu_{CO(st)}=1681,6$   $cm^{-1}$ ,  $\delta_{NH}=1484,9$   $cm^{-1}$ ,  $\delta_{CH(sim)}=1354,5$   $cm^{-1}$ ,  $\nu_{C-Cl}=1118,9$   $cm^{-1}$ ,  $\delta_{CHaromáticos}=766,3$   $cm^{-1}$ .

4.2.2.2.x. 7-cloro-5-(4'-fluorofenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (24)

Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **13** (0,28 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,68 mmol, 154 mg) da lugar a **24** con un rendimiento del 63% (54,3 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{15}H_{11}ClFNOS$ : C: 58,54%; H: 3,60%; N: 4,55%; S: 10,42%; Encontrado: C: 57,53%; H: 3,77%; N: 4,37%; S: 10,18%.

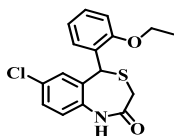
Pto. Fusión: 252 - 254 °C.

API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 308,03 (60,0%);  $[M+Na]^+$ : 330,01 (100%);  $[2M+H]^+$ : 616,05 (2,0%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,46 (m, 2H, H3'/H5'), 7,36 (s, 1H, NH), 7,26 (dd, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,6$  Hz, H8), 7,11 (m, 2H, H2'/H6'), 7,02 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H9), 6,93 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 5,61 (s, 1H, CH), 3,30 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,00 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 30,9; 45,7; 124,5; 124,6; 127,4; 127,6; 128,3; 129,6; 130,6; 132,9; 133,2; 134,2; 135,1; 135,2; 168,8.

#### 4.2.2.2.xi. 7-cloro-5-(2'-etoxifenil)-1,5-dihidro-4,1-benzotiazepin-2(3H)-ona (**25**)



Seguindo el Procedimiento general, la reacción de **14** (0,26 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,56 mmol, 143 mg) da lugar a **25** con un rendimiento del 61% (53,0 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{17}H_{16}ClNO_2S$ : C: 61,16%; H: 4,83%; N: 4,20%; S: 9,61%; Encontrado: C: 60,95%; H: 4,75%; N: 3,95%; S: 9,09%.

Pto. Fusión: 192 - 194 °C.

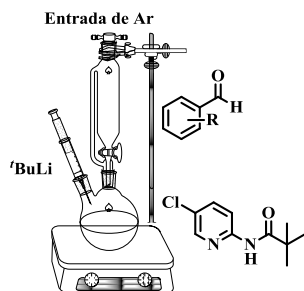
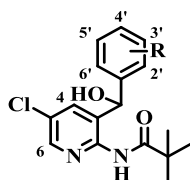
API-ES (m/z):  $[M+H^+]$ : 334,07 (100%);  $[M+Na^+]$ : 356,05 (24,5%);  $[2M+H^+]$ : 667,12 (9,5 %);  $[2M+Na^+]$ : 689,11 (15,6%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,71 (dd, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H8), 7,32 (dt, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H4'), 7,22, (dd, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H6'), 7,16 (s, 1H, NH), 7,05 (dt, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,6$  Hz, H5'), 6,99, (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H9), 6,93, (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 6,85 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3'), 6,06 (s, 1H, CH), 3,91 (m, 2H,  $^3J = 7,4$  Hz,  $OCH_2$ ), 3,27 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,03 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 1,20 (t, 3H,  $^3J = 7,4$  Hz,  $CH_3$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14,8; 30,9; 45,7; 64,90; 124,5; 124,6; 127,4; 127,6; 128,3; 129,6; 130,6; 132,9; 133,2; 134,2; 135,1; 135,2; 168,8.

### 4.2.3. - Síntesis 4,1-piridotiazepinas análogas a **CGP37157**

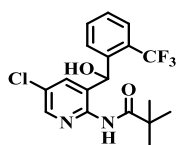
#### 4.2.3.1 Procedimiento general para la síntesis de N-(5-cloro-3-[hidroxi(aril)piridin-2-il]pivaloamida (**26-36**)



Al compuesto **3** (1 equiv) disuelto en THF recién destilado (15 ml) se añade gota a gota una solución de  $t\text{-BuLi}$  (1,7 M en hexano, 2,7 equiv) a -78 °C bajo atmósfera de Ar. Se deja 15 min a -78 °C y posteriormente se sube la temperatura a 0 °C manteniéndose durante 2-4 h. El arilaldehído correspondiente (1,1 equiv) disuelto en THF recién

destilado (5 ml) se añade gota a gota a  $-78^{\circ}\text{C}$  y se deja agitar a esta temperatura durante 15 min para luego ir subiendo la temperatura gradualmente ( $10^{\circ}\text{C}$  cada 10 min) hasta temperatura ambiente monitorizando por TLC la evolución de la reacción. Cuando la reacción no evoluciona más, se añade  $\text{H}_2\text{O}$  (15 ml). Se extrae con  $\text{Et}_2\text{O}$  ( $3 \times 30$  ml) y la fase orgánica combinada se lava con salmuera ( $3 \times 50$  ml). La fase orgánica se seca con  $\text{MgSO}_4$ , se filtra y se elimina el disolvente, obteniéndose un aceite amarillo que es purificado mediante columna cromatográfica automatizada utilizando como eluyente mezclas de  $\text{AcOEt}:\text{Hexano}$ .

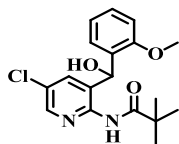
#### 4.2.3.1.i. *N*-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-trifluorometilfenil)piridin-2-il]pivaloamida) (**26**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **3** (2,35 mmol, 500 mg) con 2-trifluorometilbenzaldehído (2,58 mmol, 449 mg), da lugar a **26** con un rendimiento de 49% (424,7 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,36 (s, 1H, NH), 8,22 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 8,15 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,71 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4'), 7,58 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3'), 7,43 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H5'), 7,39 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 6,11 (s, 1H, CH), 5,24 (s, 1H, OH), 1,39 (s, 9H ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>).

#### 4.2.3.1.ii. *N*-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-metoxifenil)piridin-2-il]pivaloamida) (**27**)

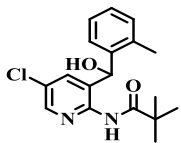


Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **3** (2,35 mmol, 500 mg) con 2-metoxibenzaldehído (2,58 mmol, 351 mg), da lugar a **27** con un rendimiento de 80% (655,8 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 9,05 (s, 1H, NH), 8,22 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,40 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,35 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3'), 7,28 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4'), 6,95 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H5'), 6,80 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 5,90 (s, 1H, CH), 4,90 (bs, 1H, OH), 3,65 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 1,39 (s, 9H ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>).



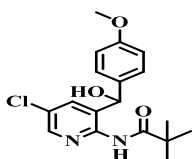
4.2.3.1.iii. *N*-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-metilfenil)piridín-2-il]pivaloamida (**28**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **3** (2,35 mmol, 500 mg) con 2-metilbenzaldehído (2,58 mmol, 309 mg), da lugar a **28** con un rendimiento de 63% (492,7 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 9,28 (s, 1H, NH), 8,10 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,39 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 7,10 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 7,00 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 5,80 (s, 1H, CH), 5,20 (bs, 1H, OH), 1,90 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,39 (s, 9H ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>).

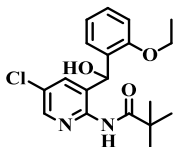
4.2.3.1.iv. *N*-(5-cloro-3-[hidroxi(4'-metoxifenil)piridín-2-il]pivaloamida (**29**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **3** (2,35 mmol, 500 mg) con 4-metoxibenzaldehído (2,58 mmol, 351 mg), da lugar a **29** con un rendimiento de 55% (450,9 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,30 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 8,20 (s, 1H, NH), 7,53 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,20 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H2', H6'), 6,90 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3', H5'), 5,75 (s, 1H, CH), 3,73 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 1,21 (s, 9H ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>).

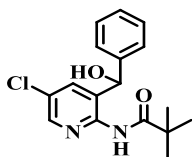
4.2.3.1.v. *N*-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-etoxifenil)piridín-2-il]pivaloamida (**30**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **3** (2,35 mmol, 500 mg) con 2-etoxibenzaldehído (2,58 mmol, 387 mg), da lugar a **30** con un rendimiento de 55% (469,0 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,50 (bs, 1H, NH), 8,30 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,49 - 7,38 (m, 3H, H4, H4', H6'), 7,00 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3'), 6,80 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H5'), 5,90 (s, 1H, CH), 4,00 (m, 3H, OH,  $\text{OCH}_2$ ), 1,33 (t, 3H,  $^3J = 9,3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,21 (s, 9H ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>).

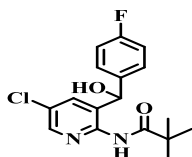
4.2.3.1.vi. *N*-(5-cloro-3-[hidroxi(fenil)piridín-2-il]pivaloamida (**31**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **3** (2,35 mmol, 500 mg) con benzaldehído (2,58 mmol, 273 mg), da lugar a **31** con un rendimiento de 31% (232,2 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,70 (bs, 1H, NH), 8,20 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,49 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,49 - 7,30 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 5,78 (s, 1H, CH), 5,23 (bs, 1H, OH), 1,21 (s, 9H ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>).

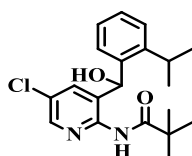
#### 4.2.3.1.vii. *N*-(5-cloro-3-[hidroxi(4'-fluorofenil)piridín-2-il]pivaloamida (**32**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **3** (2,35 mmol, 500 mg) con 4-fluorobenzaldehído (2,58 mmol, 320 mg), da lugar a **32** con un rendimiento de 53% (419,5 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,17 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,57 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,50 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H2', H6'), 7,30 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3', H5'), 6,99 (s, 1H, CH), 5,19 (bs, 2H, NH, OH), 1,49 (s, 9H ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>).

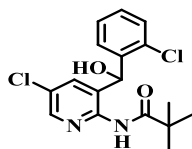
#### 4.2.3.1.viii. *N*-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-isopropilfenil)piridín-2-il]pivaloamida (**33**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **3** (2,35 mmol, 500 mg) con 2-isopropilbenzaldehído (**1**) (2,58 mmol, 382 mg), da lugar a **33** con un rendimiento de 48% (407,1 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,60 (bs, 1H, NH), 8,30 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,90 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4'), 7,45 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,35 (m, 3H, H<sub>z</sub>, H3', H5', H6'), 5,95 (s, 1H, CH), 4,70 (bs, 1H, OH), 2,60 (hp, 2H,  $^3J = 7,5$  Hz, CH), 1,51 (s, 9H ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>), 1,25 (d, 3H,  $^3J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0,70 (d, 3H,  $^3J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

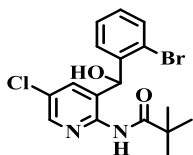
#### 4.2.3.1.ix. *N*-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-clorofenil)piridín-2-il]pivaloamida (**34**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **3** (2,35 mmol, 500 mg) con 2-clorobenzaldehído (2,58 mmol, 362 mg), da lugar a **34** con un rendimiento de 47% (390,2 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,15 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 8,05 (bs, 1H, NH), 7,90 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 7,40 (m, 3H, H3', H4', H5'), 7,20 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 5,95 (s, 1H, CH), 5,00 (bs, 1H, OH), 1,51 (s, 9H ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>).

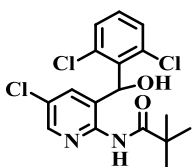
#### 4.2.3.1.x. *N*-(5-cloro-3-[hidroxi(2'-bromofenil)piridín-2-il]pivaloamida (**35**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **3** (2,35 mmol, 500 mg) con 2-bromobenzaldehído (2,58 mmol, 477 mg), da lugar a **35** con un rendimiento de 74% (691,6 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 9,10 (bs, 1H, NH), 8,15 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,90 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 7,40 (t, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3', H5'), 7,30 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,10 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4'), 5,80 (s, 1H, CH), 5,35 (bs, 1H, OH), 1,40 (s, 9H ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>).

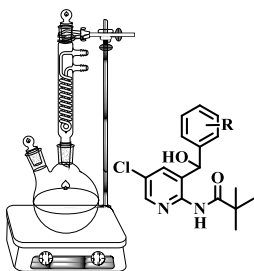
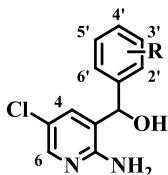
#### 4.2.3.1.xi. *N*-(5-cloro-3-[hidroxi(2',6'-diclorofenil)piridín-2-il]pivaloamida (**36**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **3** (2,35 mmol, 500 mg) con 2,6-diclorobenzaldehído (2,58 mmol, 451 mg), da lugar a **36** con un rendimiento de 38% (346,2 mg).

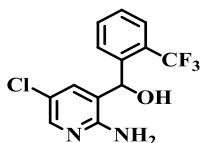
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,80 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,30 - 7,20 (m, 4H, H4, H3', H4', H5'), 4,75 (bs, 2H, CH, OH), 1,20 (s, 9H ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>).

#### 4.2.3.2 Procedimiento general para la síntesis de (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(aril)metanol (**37-47**)



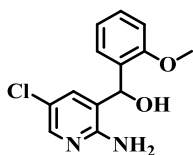
Los intermedios **26-36** (1 equiv) en 1,4-dioxano (50 ml) es añadido a una solución de KOH 2M (50 ml) y se deja agitar a reflujo durante 24 h. Transcurrido este tiempo, la reacción se lleva a temperatura ambiente y se extrae con AcOEt (3 × 50 ml). La fase orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se elimina el disolvente, obteniéndose un aceite amarillo que no necesita

purificación.

4.2.3.2.i. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-trifluorometilfenil)metanol (37)

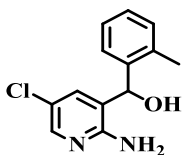
Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **26** (0,54 mmol, 200 mg) con KOH da lugar a **37** con rendimiento cuantitativo (163,4 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,83 (d, 2H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4, H6), 7,74 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3'), 7,52 (dd, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H6'), 7,49 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4'), 7,05 (d, 1H  $^4J = 1,8$  Hz, H5'), 6,10 (s, 1H, CH), 4,95 (s, 3H, OH,  $\text{NH}_2$ ).

4.2.3.2.ii. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-metoxifenil)metanol (38)

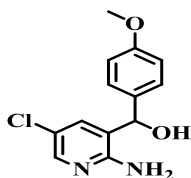
Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **27** (0,57 mmol, 200 mg) con KOH da lugar a **38** con rendimiento cuantitativo (150,9 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,90 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,39 (dt, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H4'), 7,20 (dd, 2H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H3', H6'), 7,00 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H5'), 6,98, (d, 1H  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 5,90 (s, 1H, CH), 5,10 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3,83 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

4.2.3.2.iii. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-metilfenil)metanol (39)

Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **28** (0,60 mmol, 200 mg) con KOH da lugar a **39** con rendimiento cuantitativo (149,2 mg).

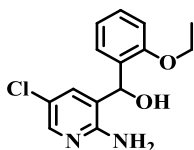
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,70 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,39 - 7,20 (m, 4H, H<sub>aromáticos</sub>), 7,00 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 5,80 (s, 1H, CH), 5,50 (s, 3H, OH,  $\text{NH}_2$ ), 2,20 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

4.2.3.2.iv. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(4'-metoxifenil)metanol (40)

Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **29** (0,57 mmol, 200 mg) con KOH da lugar a **40** con rendimiento cuantitativo (150,9 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,90 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,30 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H2', H6'), 7,20 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 6,90 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3', H5'), 5,60 (s, 1H, CH), 4,83 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3,63 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ).

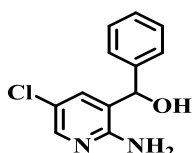
#### 4.2.3.2.v. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-etoxifenil)metanol (**41**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **30** (0,55 mmol, 200 mg) con KOH, da lugar a **41** con rendimiento cuantitativo (153,3 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,69 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,43 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,35 - 7,20 (m, 2H, H3', H4'), 6,98 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H5'), 6,88 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 5,90 (s, 1H, CH), 4,00 (m, 2H,  $^3J = 9,3$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 1,33 (t, 3H,  $^3J = 9,3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

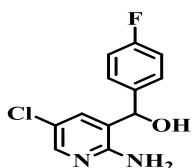
#### 4.2.3.2.vi. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(fenil)metanol (**42**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **31** (0,62 mmol, 200 mg) con KOH da lugar a **42** con rendimiento cuantitativo (145,5 mg).

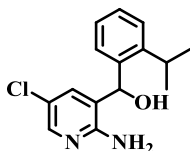
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,85 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,49 - 7,30 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 7,23 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 5,78 (s, 1H, CH), 4,90 (bs, 3H, OH,  $\text{NH}_2$ ).

#### 4.2.3.2.vii. 4 (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(4'-fluorofenil)metanol (**43**)



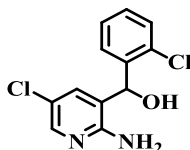
Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **32** (0,59 mmol, 200 mg) con KOH da lugar a **43** con rendimiento cuantitativo (149,1 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,94 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,22 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,37 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H2', H6'), 7,08 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3', H5'), 5,71 (s, 1H, CH), 4,87 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

4.2.3.2.viii. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-isopropilfenil)metanol (44)

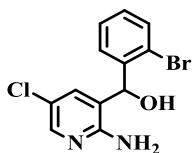
Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **33** (0,55 mmol, 200 mg) con KOH da lugar a **44** con rendimiento cuantitativo (152,2 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,30 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,90 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4'), 7,45 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,35 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3', H5'), 7,26 (m, 1H, H6'), 5,95 (s, 1H, CH), 4,70 (bs, 3H, OH,  $\text{NH}_2$ ), 2,60 (hp, 2H,  $^3J = 7,5$  Hz, CH), 1,25 (d, 3H,  $^3J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0,70 (d, 3H,  $^3J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

4.2.3.2.ix. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-clorofenil)metanol (45)

Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **34** (0,56 mmol, 200 mg) con KOH da lugar a **45** con rendimiento cuantitativo (165,8 mg).

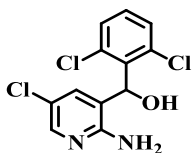
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,70 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,40 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 7,25 (m, 3H, H3', H4', H5'), 7,00 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 5,95 (s, 1H, CH), 4,95 (bs, 3H,  $\text{NH}_2$ , OH).

4.2.3.2.x. (2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-bromofenil)metanol (46)

Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **35** (0,50 mmol, 200 mg) con KOH da lugar a **46** con rendimiento cuantitativo (156,8 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,78 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,58 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 7,49 (dd, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H3'), 7,35 (dt, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H5'), 7,20 (dt, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H4'), 7,07 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 5,98 (s, 1H, CH), 5,03 (bs, 3H, OH,  $\text{NH}_2$ ).

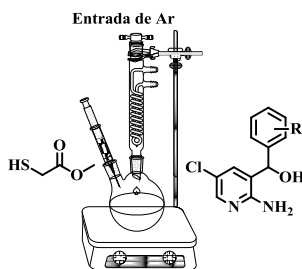
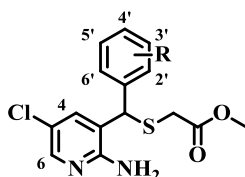
#### 4.2.3.2.xi. (2-amino-5-cloropiridin-3-il)(2',6'-diclorofenil)metanol (**47**)



Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **36** (0,52 mmol, 200 mg) con KOH da lugar a **47** con rendimiento cuantitativo (157,9 mg).

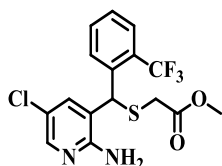
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,80 (d, 1H,  $^4J$  = 1,8 Hz, H6), 7,30 - 7,20 (m, 4H, H4, H3', H4', H5'), 4,75 (bs, 4H, CH, OH,  $\text{NH}_2$ ).

#### 4.2.3.3 Procedimiento general para la síntesis de 2-((2-amino-5-cloropiridin-3-il)(aril)metiltio)acetato de metilo (**48-58**)



A los intermedios **37-47** (1 equiv) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) se le añade tioglicolato de metilo (6 equiv) y TFA (10 ml) bajo atmósfera de Ar. La mezcla se agita a 45 °C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida y el residuo se disuelve en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml), se lava con solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$  al 10% (30 ml),  $\text{NaOH}$  30% (30 ml) y salmuera (30 ml). La fase orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se elimina el disolvente. El aceite que se obtiene es purificado mediante columna cromatográfica automatizada utilizando como eluyente mezclas de  $\text{AcOEt}$ :Hexano.

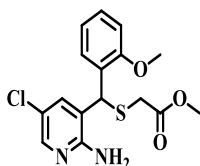
4.2.3.3.i. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-trifluorometilfenil)metiltio)acetato de metilo (48)



Seguindo el Procedimiento general, la reacción de **37** (0,33 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,98 mmol, 182 mg) da lugar a **48** con un rendimiento del 30% (38,7 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,21 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,90 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,75 (dt, 2H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H4', H5'), 7,49 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3'), 6,90 (d, 1H  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 5,65 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5,58 (s, 1H, CH), 3,73 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,15 (d, 1H,  $^2J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,05 (d, 1H,  $^2J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ).

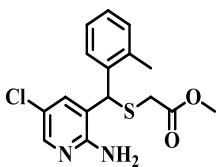
4.2.3.3.ii. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-metoxifenil)metiltio)acetato de metilo (49)



Seguindo el Procedimiento general, la reacción de **38** (0,38 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (2,28 mmol, 210 mg) da lugar a **49** con un rendimiento del 89% (119,3 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,90 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,69 (dd, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H3'), 7,35 (dt, 2H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H4, H4'), 7,09 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H5'), 6,90 (d, 1H  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 5,65 (s, 1H, CH), 5,20 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3,83 (s, 3H,  $\text{PhOCH}_3$ ), 3,60 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,15 (d, 1H,  $^2J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,13 (d, 1H,  $^2J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ).

4.2.3.3.iii. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-metilfenil)metiltio)acetato de metilo (50)

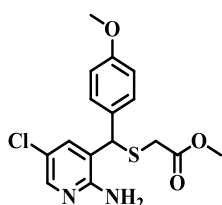


Seguindo el Procedimiento general, la reacción de **39** (0,40 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (2,41 mmol, 222 mg) da lugar a **50** con un rendimiento del 63% (84,9 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,90 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,80 (dd, 1H,  $^3J = 8,5$  /  $^4J = 1,8$  Hz, H3'), 7,35 - 7,18 (m, 3H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 6,98 (d, 1H  $^3J = 8,5$  Hz, H4), 5,45 (s, 1H, CH), 5,40 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3,73 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,15 (d, 1H,  $^2J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,12 (d, 1H,  $^2J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2,10 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).



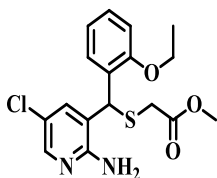
4.2.3.3.iv. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(4'-metoxifenil)metiltio)acetato de metilo (51)



Seguindo el Procedimiento general, la reacción de **40** (0,38 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (2,28 mmol, 210 mg) da lugar a **51** con un rendimiento del 86% (115,3 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,90 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,40 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H2', H6'), 7,10 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 6,90 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3', H5'), 5,65 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5,12 (s, 1H, CH), 3,83 (s, 3H,  $\text{PhOCH}_3$ ), 3,70 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,15 (d, 1H,  $^2J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,13 (d, 1H,  $^2J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ).

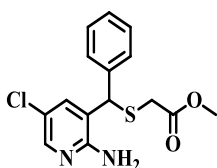
4.2.4.3.v. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-etoxifenil)metiltio)acetato de metilo (52)



Seguindo el Procedimiento general, la reacción de **41** (0,36 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (2,10 mmol, 193 mg) da lugar a **52** con un rendimiento del 46% (132,1 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,96 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,65 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3'), 7,40 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,30 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4'), 7,10 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H5'), 6,98 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 5,70 (s, 1H, CH), 5,30 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 4,00 (m, 2H,  $^3J = 9,3$  Hz,  $\text{OCH}_2$ ), 3,70 (s, 3H  $\text{OCH}_3$ ), 3,20 (d, 1H,  $^2J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,15 (d, 1H,  $^2J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 1,45 (t, 3H,  $^3J = 9,3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

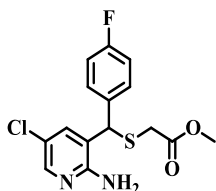
4.2.3.3.vi. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(fenil)metiltio)acetato de metilo (53)



Seguindo el Procedimiento general, la reacción de **42** (0,43 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (2,55 mmol, 234 mg) da lugar a **53** con un rendimiento del 67% (93,0 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,90 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,49 - 7,30 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 7,08 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 5,55 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5,20 (s, 1H, CH), 3,63 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,23 (d, 1H,  $^2J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,21 (d, 1H,  $^2J = 18,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ).

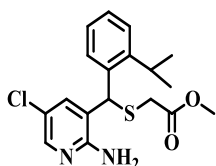
4.2.3.3.vii. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(4'-fluorofenil)metiltio)acetato de metilo (54)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **43** (0,40 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (2,37 mmol, 218 mg) da lugar a **54** con un rendimiento del 64% (87,2 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,85 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,37 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H2', H6'), 7,01 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3', H5'), 6,91 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 5,30 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5,13 (s, 1H, CH), 3,66 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,09 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,08 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ).

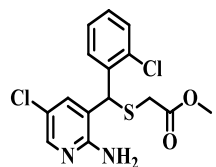
4.2.3.3.viii. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-isopropilfenil)metiltio)acetato de metilo (55)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **44** (0,36 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (2,16 mmol, 198 mg) da lugar a **55** con un rendimiento del 70% (92,0 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,90 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,80 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4'), 7,40 - 7,30 (m, 3H, H3', H5', H6'), 6,90 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4), 5,95 (s, 1H, CH), 5,70 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3,55 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,14 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,10 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 2,60 (hp, 2H,  $^3J = 7,5$  Hz, CH), 1,25 (d, 3H,  $^3J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 0,70 (d, 3H,  $^3J = 7,5$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).

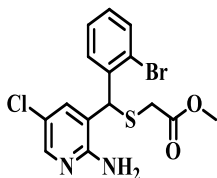
4.2.3.3.ix. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-clorofenil)metiltio)acetato de metilo (56)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **45** (0,33 mmoles, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,98 mmol, 182 mg) da lugar a **56** con un rendimiento del 63% (74,3 mg).

$^1\text{H-RMN}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,00 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 7,80 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,40 - 7,20 (m, 3H, H3', H4', H5'), 6,95 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 5,60 (s, 1H, CH), 3,70 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,18 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,10 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ).

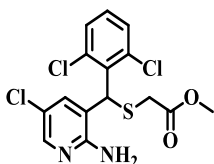
4.2.3.3.x. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2'-bromofenil)metiltio)acetato de metilo (**57**)



Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **46** (0,32 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,92 mmol, 176 mg) da lugar a **57** con un rendimiento del 33% (42,4 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,90 (d, 1H,  $^4J$  = 1,8 Hz, H6), 7,85 (d, 1H,  $^3J$  = 8,5 Hz, H6'), 7,55 (d, 1H,  $^3J$  = 8,5 Hz, H3'), 7,45 (t, 1H,  $^3J$  = 8,5 Hz, H5'), 7,25 (t, 1H,  $^3J$  = 8,5 Hz, H4'), 6,90 (d, 1H,  $^4J$  = 1,8 Hz, H4), 5,60 (s, 1H, CH), 5,40 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3,75 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,21 (d, 1H,  $^2J$  = 12,1 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,10 (d, 1H,  $^2J$  = 12,1 Hz,  $\text{CH}_2$ ).

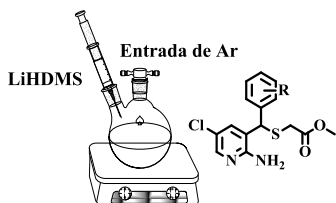
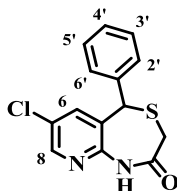
4.2.3.3.xi. 2-((2-amino-5-cloropiridín-3-il)(2',6'-diclorofenil)metiltio)acetato de metilo (**58**)



Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **47** (0,33 mmol, 100 mg) con tioglicolato de metilo (1,98 mmol, 182 mg) da lugar a **58** con un rendimiento del 75% (97,0 mg).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,90 (d, 1H,  $^4J$  = 1,8 Hz, H6), 7,50 - 7,30 (m, 3H, H3', H4', H5'), 6,80 (d, 1H,  $^4J$  = 1,8 Hz, H4), 6,75 (s, 1H, CH), 5,60 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3,75 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3,25 (d, 1H,  $^2J$  = 12,1 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,17 (d, 1H,  $^2J$  = 12,1 Hz,  $\text{CH}_2$ ).

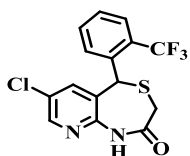
4.2.3.4 Procedimiento general para la síntesis de 7-cloro-5-(aril)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (**59-69**)



A los intermedios **48-58** (1 equiv) en THF recién destilado (15 ml) se añade gota a gota una solución de bis (trimetilsilil)amiduro de litio (LiHDMS) (1,0 M en hexano, 2 equiv) a  $-78^\circ\text{C}$  bajo atmósfera de Ar. Se deja 15 minutos a  $-78^\circ\text{C}$

°C y posteriormente se deja alcanzar temperatura ambiente. Se agita a esta temperatura durante 24 h. La reacción se interrumpe con la adición de una solución saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (50 ml), se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 30$  ml) y la fase orgánica se lava con salmuera ( $3 \times 50$  ml), se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtra y se elimina el disolvente, obteniendo un aceite amarillo que es purificado mediante columna cromatográfica automatizada de gel de sílice basificada con  $\text{NH}_3$  al 2% utilizando como eluyente mezclas de  $\text{AcOEt}$ :Hexano.

4.2.3.4.i. 7-cloro-5-(2'-trifluorometilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (59)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **48** (0,26 mmol, 100 mg) con LiHDMS (0,52 mmol, 87 mg) da lugar a **59** con un rendimiento del 50% (46,6 mg).

Análisis químico calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{OS}$ : C: 50,22%; H: 2,81%;

N: 7,81%; S: 8,94%; Encontrado: C: 50,72%; H: 3,06%; N: 7,67%; S: 8,62%

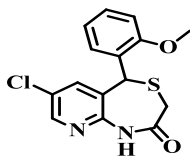
Pto. Fusión: 191 - 192 °C

API-ES (m/z):  $[\text{M}+\text{H}^+]$ : 359,03 (100%);  $[\text{M}+\text{Na}^+]$ : 381,01 (25,4%);  $[2\text{M}+\text{H}^+]$ : 717,05 (9,5%);  $[2\text{M}+\text{Na}^+]$ : 739,03 (1,7%).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,30 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H8), 8,10 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3'), 7,90 (s, 1H, NH), 7,75 (m, 2H, H4', H6'), 7,58 (t, 1H  $^3J = 8,5$  Hz, H5'), 7,43 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 6,11 (s, 1H, CH), 3,42 (d, 1H,  $^2J = 17,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,11 (d, 1H,  $^2J = 17,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 30,9; 45,7; 124,5; 124,6; 127,4; 127,6; 128,3; 129,6; 130,6; 132,9; 133,2; 134,2; 135,1; 135,2; 168,8.

4.2.3.4.ii. 7-cloro-5-(2'-metoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (60)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **49** (0,28 mmol, 100 mg) con LiHDMS (0,57 mmol, 95 mg) da lugar a **60** con un rendimiento del 30% (27,0 mg).

Análisis químico calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$ : C: 56,16%; H: 4,08%;

N: 8,73%; S: 10,00%; Encontrado: C: 56,59%; H: 4,50%; N: 8,04%; S: 10,28%

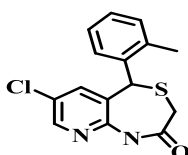
Pto. Fusión: 192 - 193 °C

API-ES (m/z): [M+H<sup>+</sup>]: 321,04 (100%); [M+Na<sup>+</sup>]: 343,04 (32,6%); [2M+H<sup>+</sup>]: 641,05 (18,0%); [2M+Na<sup>+</sup>]: 663,08 (6,3%).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 8,28 (d, 1H, <sup>4</sup>J = 1,8 Hz, H8), 7,70 (m, 2H, H6, NH), 7,40 (t, 1H, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, H4'), 7,25 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, H6'), 7,10 (t, 1H <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, H5'), 6,90 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, H3'), 6,05 (s, 1H, CH), 3,73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,35 (d, 1H, <sup>2</sup>J = 12,1 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,10 (d, 1H, <sup>2</sup>J = 12,1 Hz, CH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 32,0; 39,9; 55,6; 111,2; 120,8; 123,8; 129,7; 130,1; 130,3; 130,3; 137,3; 146,3; 148,6; 156,6; 169,6.

#### 4.2.3.4.iii. 7-cloro-5-(2'-metilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (**61**)



Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **50** (0,30 mmol, 100 mg) con LiHDMS (0,60 mmol, 100 mg) da lugar a **61** con un rendimiento del 65% (59,4 mg).

Análisis químico calculado para C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>OS: C: 59,11%; H: 4,30%; N: 9,19%; S: 10,52%; Encontrado: C: 58,63%; H: 4,52%; N: 9,03%; S: 10,23%

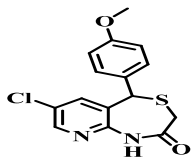
Pto. Fusión: 185 - 186 °C

API-ES (m/z): [M+H<sup>+</sup>]: 305,03 (36,6%); [M+Na<sup>+</sup>]: 327,04 (100%); [2M+H<sup>+</sup>]: 609,08 (16,4%); [2M+Na<sup>+</sup>]: 631,08 (1,6%).

<sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 8,28 (d, 1 H, <sup>4</sup>J = 1,8 Hz, H8), 8,05 (s, 1H, NH), 7,65 (d, 1H, <sup>3</sup>J = 8,5 Hz, H3'), 7,39 - 7,20 (m, 3H, H<sub>aromáticos</sub>), 7,10 (d, 1H, <sup>4</sup>J = 1,5 Hz, H6), 5,83 (s, 1H, CH), 3,49 (d, 1H, <sup>2</sup>J = 12,1 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,12 (d, 1H, <sup>2</sup>J = 12,1 Hz, CH<sub>2</sub>), 2,10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

<sup>13</sup>C-RMN (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) = 19,1; 31,6; 42,9; 126,2; 128,4; 128,8; 129,4; 129,5; 131,1; 133,3; 136,0; 136,9; 146,1; 148,3; 169,3.

#### 4.2.3.4.iv. 7-cloro-5-(4'-metoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (**62**)



Seguendo el Procedimiento general, la reacción de **51** (0,28 mmol, 100 mg) con LiHDMS (0,56 mmol, 93 mg) da lugar a **62** con un rendimiento del 62% (55,7 mg).

Análisis químico calculado para C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S: C: 56,16%; H: 4,08%; N: 8,73%; S: 10,00%; Encontrado: C: 55,85%; H: 4,33%; N: 8,27%; S: 9,96%

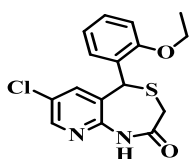
Pto. Fusión: 224 - 225 °C

API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 305,03 (26,6%);  $[M+Na]^+$ : 327,04 (100%);  $[2M+H]^+$ : 609,08 (26,4%);  $[2M+Na]^+$ : 631,08 (10,6%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,30 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H8), 7,55 (bs, 1H, NH), 7,40 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H2', H6'), 7,30 (d, 1H,  $^4J = 8,5$  Hz, H6), 7,00 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3', H5'), 5,62 (s, 1H, CH), 3,83 (s, 3H,  $OCH_3$ ), 3,40 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,10 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 32,0; 46,3; 55,4; 114,4; 114,5; 127,0; 129,6; 130,4; 130,7; 130,7; 137,5; 146,3; 148,3; 159,3; 169,6.

#### 4.2.3.4.v. 7-cloro-5-(2'-etoxifenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (**63**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **52** (0,28 mmol, 100 mg) con LiHDMS (0,26 mmol, 93 mg) da lugar a **63** con un rendimiento del 45% (42,2 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{16}H_{15}ClN_2O_2S$ : C: 57,40%; H: 4,52%; N: 8,37%; S: 9,58%; Encontrado: C: 57,13%; H: 4,62%; N: 8,14%; S: 9,43%

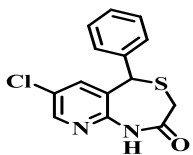
Pto. Fusión: 191 - 192 °C

API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 335,05 (36,6%);  $[M+Na]^+$ : 357,05 (100%);  $[2M+H]^+$ : 669,1 (17,6%);  $[2M+Na]^+$ : 691,1 (6,8%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,23 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H8), 7,65 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3'), 7,50 (bs, 1H, NH), 7,38 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4'), 7,30 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,05 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H5'), 6,88 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 5,98 (s, 1H, CH), 3,93 (m, 2H,  $^3J = 9,3$  Hz,  $OCH_2$ ), 3,30 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,12 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 1,23 (t, 3H,  $^3J = 9,3$  Hz,  $CH_3$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 14,5; 31,7; 40,6; 63,7; 99,7; 111,8; 120,5; 129,5; 129,7; 137,3; 137,7; 137,6; 145,7; 155,8; 163,2; 169,1.

#### 4.2.3.4.vi. 7-cloro-5-fenil-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (**64**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **53** (0,31 mmol, 100 mg) con LiHDMS (0,62 mmol, 103 mg) da lugar a **64** con un rendimiento del 61% (55,0 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{14}H_{11}ClN_2OS$ : C: 57,83%; H: 3,81%; N: 9,63%; S: 11,03%; Encontrado: C: 57,71%; H: 3,90%; N: 9,91%; S: 10,96%

Pto. Fusión: 181 - 182 °C

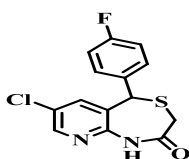
API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 291,03 (100%);  $[M+Na]^+$ : 313,03 (25,7%);  $[2M+H]^+$ : 581,06 (5,7%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,20 (d, 1H,  $^4J$  = 1,8 Hz, H8), 8,00 (bs, 1H, NH), 7,49 - 7,40 (m, 5H,  $H_{aromáticos}$ ), 7,20 (d, 1H,  $^4J$  = 1,8 Hz, H6), 5,60 (s, 1H, CH), 3,39 (d, 1H,  $^2J$  = 12,1 Hz,  $CH_2$ ), 3,12 (d, 1H,  $^2J$  = 12,1 Hz,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 30,9; 45,7; 124,5; 124,6; 127,4; 127,6; 128,3; 129,6; 130,6; 132,9; 133,2; 134,2; 135,1; 135,2; 168,8.

#### 4.2.3.4.vii. 7-cloro-5-(4'-fluorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona

(65)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **54** (0,29 mmol, 100 mg) con LiHDMS (0,58 mmol, 97 mg) da lugar a **65** con un rendimiento del 77% (68,8 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{14}H_{10}ClFN_2OS$ : C: 54,46%; H: 3,26%; N: 9,07%; S: 10,39%; Encontrado: C: 54,71%; H: 3,58%; N: 8,91%; S: 10,26%

Pto. Fusión: 202 - 204 °C

API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 309,02 (100%);  $[M+Na]^+$ : 332,02 (34,5%);  $[2M+H]^+$ : 617,04 (27,5%).

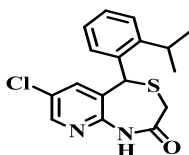
$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,21 (d, 1H,  $^4J$  = 1,8 Hz, H8), 7,74 (bs, 1H, NH), 7,36 (d, 2H,  $^3J$  = 8,5 Hz, H2', H6'), 7,30 (d, 1H,  $^4J$  = 1,8 Hz, H6), 7,06 (d, 2H,  $^3J$  = 8,5 Hz, H3', H5'), 5,53 (s, 1H, CH), 3,27 (d, 1H,  $^2J$  = 12,1 Hz,  $CH_2$ ), 3,07 (d, 1H,  $^2J$  = 12,1 Hz,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31,1; 45,1; 115,4; 115,9; 127,8; 130,6; 130,9; 131,1; 133,1; 137,0; 146,1; 149,7; 161,7; 168,8.

FTIR (KBr):  $\nu_{NH(st)}$ =3415,3  $cm^{-1}$ ,  $\nu_{CHaromáticos(st)}$ =3172,3  $cm^{-1}$ ,  $\nu_{CHalifáticos(st)}$ =2925,4  $cm^{-1}$ ,  $\nu_{CO(st)}$ =1687,4  $cm^{-1}$ ,  $\delta_{NH}$ =1507,1  $cm^{-1}$ ,  $\delta_{CH(sim)}$ =1427,6  $cm^{-1}$ ,  $\nu_{C-F}$ =1227,5  $cm^{-1}$ ,  $\nu_{C-Cl}$ =1134,9  $cm^{-1}$ ,  $\delta_{CHaromáticos}$ =830,2  $cm^{-1}$ .

#### 4.2.3.4.viii. 7-cloro-5-(2'-isopropilfenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona

(66)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **55** (0,27 mmol, 100 mg) con LiHDMS (0,54 mmol, 90 mg) da lugar a **66** con un rendimiento del 48% (43,1 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{17}H_{17}ClN_2OS$ : C: 58,19%; H: 5,46%; N: 7,98%; S: 9,63%; Encontrado: C: 58,19%; H: 5,63%; N: 8,01%; S: 9,53%

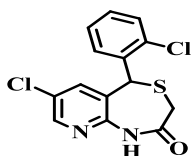
Pto. Fusión: 190 - 191 °C

API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 333,08 (100%);  $[M+Na]^+$ : 355,08 (36,5%);  $[2M+H]^+$ : 665,16 (18,6%);  $[2M+Na]^+$ : 687,16 (6,0%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 9,10 (s, 1H, NH), 8,20 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H8), 7,60 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4'), 7,40 - 7,30 (m, 3H, H3', H5', H6'), 7,10 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6), 5,95 (s, 1H, CH), 3,39 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,12 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 2,60 (hp, 2H,  $^3J = 7,5$  Hz, CH), 1,25 (d, 3H,  $^3J = 7,5$  Hz,  $CH_3$ ), 0,70 (d, 3H,  $^3J = 7,5$  Hz,  $CH_3$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 23,4; 24,0; 28,9; 32,0; 42,4; 126,1; 126,6; 129,1; 129,5; 129,7; 130,4; 131,9; 137,4; 146,4; 146,9; 148,2; 169,4.

#### 4.2.4.4.ix. 7-cloro-5-(2'-clorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (**67**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **56** (0,28 mmol, 100 mg) con LiHDMS (0,56 mmol, 93 mg) da lugar a **67** con un rendimiento del 43% (39,2 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{14}H_{10}Cl_2N_2OS$ : C: 51,70%; H: 3,10%;

N: 8,61%; S: 9,86%; Encontrado: C: 51,68%; H: 3,56%; N: 8,37%; S: 9,96%

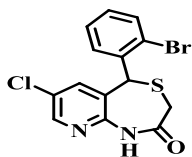
Pto. Fusión: 183 - 185 °C

API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 324,99 (31,2%);  $[M+Na]^+$ : 346,9 (7,2%);  $[2M+H]^+$ : 648,9 (7,1%).

$^1H$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 9,10 (s, 1H, NH), 8,25 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H8), 7,70 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4'), 7,40 - 7,30 (m, 3H, H3', H5', H6'), 6,90 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6), 5,95 (s, 1H, CH), 3,25 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ), 3,00 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $CH_2$ ).

$^{13}C$ -RMN (300 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 31,8; 43,5; 127,4; 129,4; 129,8; 130,2; 130,6; 130,8; 133,5; 134,2; 137,1; 146,7; 148,6; 169,2.

#### 4.2.3.4.x. 7-cloro-5-(2'-bromofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-e][4,1]tiazepin-2(1H)-ona (**68**)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **57** (0,24 mmol, 100 mg) con LiHDMS (0,48 mmol, 80 mg) da lugar a **68** con un rendimiento del 30% (26,6 mg).

Análisis químico calculado para  $C_{14}H_{10}BrClN_2OS$ : C: 45,49%; H: 2,73%; N: 7,58%; S: 8,67%; Encontrado: C: 45,34%; H: 3,04%; N: 7,38%; S:

8,96%

Pto. Fusión: 201 - 202 °C

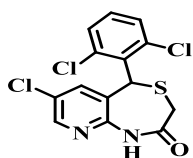
API-ES (m/z):  $[M+H]^+$ : 370,9 (100%);  $[M+Na]^+$ : 392,9 (26,7%);  $[2M+H]^+$ : 738,8 (44,7%).



$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 9,05 (bs, 1H, NH), 8,45 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H8), 7,80 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H6'), 7,60 (d, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3'), 7,49 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H5'), 7,25 (t, 1H,  $^3J = 8,5$  Hz, H4'), 7,05 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 6,00 (s, 1H, CH), 3,40 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,10 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 31,7; 46,0; 124,7; 127,9; 128,4; 128,8; 130,3; 130,8; 133,9; 135,9; 136,9; 146,6; 149,7; 168,8.

#### 4.2.3.4.xi. 7-cloro-5-(2',6'-diclorofenil)-3,5-dihidropirido[2,3-*e*][4,1]tiazepin-2(1*H*)-ona (69)



Siguiendo el Procedimiento general, la reacción de **58** (0,26 mmol, 100 mg) con LiHDMS (0,52 mmol, 87 mg) da lugar a **69** con un rendimiento del 76% (71,1 mg).

Análisis químico calculado para  $\text{C}_{14}\text{H}_9\text{Cl}_3\text{N}_2\text{OS}$ : C: 46,75%; H: 2,52%; N: 7,79%; S: 8,92%; Encontrado: C: 46,30%; H: 2,10%; N: 7,91%; S: 8,66%

Pto. Fusión: 216 - 217 °C

API-ES (m/z):  $[\text{M}+\text{H}^+]$ : 358,95 (100%);  $[\text{M}+\text{Na}^+]$ : 380,95 (34,7%);  $[2\text{M}+\text{H}^+]$ : 716,9 (16,6%);  $[2\text{M}+\text{Na}^+]$ : 738,03 (5,4%).

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,35 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H8), 8,10 (bs, 1H, NH), 7,50 - 7,30 (m, 3H, H3', H4', H5'), 7,25 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 6,49 (s, 1H, CH), 3,75 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3,50 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz,  $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$ -RMN (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 30,9; 45,7; 124,5; 124,6; 127,4; 127,6; 128,3; 129,6; 130,6; 132,9; 133,2; 134,2; 135,1; 168,8.

### 4.3. - Materiales y métodos de evaluación farmacológica

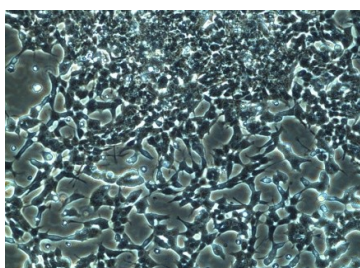
#### 4.3.1. Materiales utilizados

El medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés "*Dulbecco's Modified Eagle Medium*"), el suero fetal bovino (SFB), tripsina-EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético, por sus siglas en inglés "*Ethylenediaminetetraacetic acid*"), L-Glutamina y los antibióticos penicilina y estreptomycin fueron suministrados por Lonza (Walkersville, USA). La mezcla de nutrientes para preparar medio de cultivo, F-12 (Ham12), el medio mínimo esencial de Eagle (EMEM, por sus siglas en inglés "*Eagle's Minimal Essential*"),

*Medium*"), los aminoácidos no esenciales, el piruvato de sodio, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el kit de medición de LDH (Lactato deshidrogenasa, de sus siglas en inglés "*Lactate Dehydrogenase*") fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España).

#### 4.3.2. - Líneas celulares utilizadas

##### 4.3.2.1. - Células SH-SY5Y



Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y son una sublínea clonada 3 veces de una biopsia de médula ósea derivada de la línea SK-N-SH (ECACC nº 86012802). Tienen actividad dopamina  $\beta$ -hidroxilasa y puede convertir el glutamato (Glu) en el neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA)<sup>[124,125]</sup>. Estas células presentan una morfología característica, son de gran tamaño, adherentes y en cultivo crecen en monocapa.

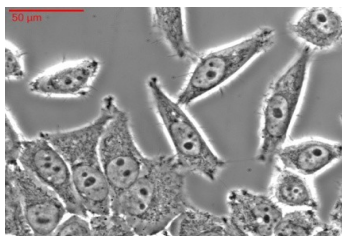
Las células están almacenadas en N<sub>2</sub> líquido (-173 °C) en medio celular con un 20% de SFB y 10% DMSO, y para su siembra en el laboratorio se mantienen en botella de plástico estéril de 75 - 150 cm<sup>2</sup> (Corning, Madrid, España). El medio de cultivo utilizado fue una mezcla 1:1 de EMEM y mezcla de nutrientes F-12 (Ham12) suplementado con 15 aminoácidos no esenciales, 23 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM de piruvato de sodio, 10% de SFB inactivado por calor, 100 UI·ml<sup>-1</sup> de penicilina y 100 mg·ml<sup>-1</sup> de estreptomycin. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. El medio de cultivo se sustituyó cada tres días por medio de cultivo fresco,

<sup>124</sup> Biedler, J.L.; Roffler-Tarlov, S.; Schachner, M.; Freedman, L.S. (1978) Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Res.* **38**:3751-3757.

<sup>125</sup> Ross, R.A.; Spengler, B.A.; Biedler, J.L. (1983) Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **71**:741-747.

y cuando las células llegan a una confluencia del 70 - 80% se realizan pases añadiendo tripsina-EDTA.

#### 4.3.2.2. - Células HeLa



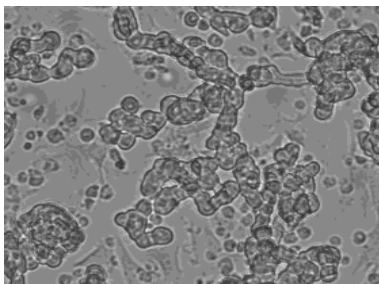
Las células HeLa son una línea celular inmortalizada de carcinoma de útero humano. Esta línea celular presenta la ventaja de ser células no excitables ya que carecen de CCDV, no poseen CICR, ni r-Ry permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  en el RE. Tampoco tienen NCX en su membrana plasmática<sup>[126]</sup>. Estas células presentan una morfología poligonal característica, son de gran tamaño, adherentes y en cultivo crecen en monocapa.

Las células están almacenadas en  $\text{N}_2$  líquido ( $-173\text{ }^\circ\text{C}$ ) en medio celular con un 20% de SFB y 10% DMSO, para su siembra en el laboratorio se mantienen en botella de plástico estéril de 75 - 150  $\text{cm}^2$ . Se utilizó DMEM con alta concentración de glucosa ( $4500\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) como medio de cultivo suplementado con 10% de SFB inactivado por calor, 2 mM de *L*-Glutamina y 50  $\text{UI}\cdot\text{ml}^{-1}$  de penicilina y 50  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  en una atmósfera humidificada de 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire. El medio de cultivo se sustituyó cada tres días por medio de cultivo fresco, y cuando las células llegan a una confluencia del 70 - 80% se realizan pases.

#### *4.3.3. - Cultivo primario de células cromafines bovinas*

Las glándulas adrenales se obtuvieron de uno de los mataderos de Madrid bajo la supervisión del servicio veterinario local. Las células cromafines

<sup>126</sup> Macville, M.; Schröck, E.; Padilla-Nash, H. (1999) Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.* **59**:1:141-50.



bovinas<sup>[127]</sup> (CCB) de la médula adrenal se aislaron como se describió previamente, con algunas modificaciones<sup>[128]</sup>. Las células se suspendieron en DMEM suplementado con 5% de SFB, 50 UI·ml<sup>-1</sup> de penicilina y 50 ng·ml<sup>-1</sup> de estreptomycin. Para la siembra, se utilizó DMEM con inhibidores de la proliferación celular (10 μmol·l<sup>-1</sup> arabinósido de citosina, 10 μmol·l<sup>-1</sup> fluorodeoxiuridina, y 10 μmol·l<sup>-1</sup> leucina metil éster), para evitar el crecimiento excesivo de los fibroblastos y células endoteliales que podría enmascarar la medida de muerte de las células cromafines. La determinación total del número de células se llevó a cabo según el procedimiento descrito previamente<sup>[129]</sup>. Para estudios de muerte celular, las células se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^5$  células / pocillo en placas de 24 (Corning, Madrid, España). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire.

#### 4.3.4. - Preparación de rodajas de hipocampo de rata

Para los experimentos en rodajas de hipocampo se utilizaron ratas Sprague-Dawley de 2 meses de edad y entre 275 - 325 g de peso, procedentes de una colonia de nuestro animalario. Se manipularon de acuerdo a la directiva publicada por la Unión Europea para estos fines y así como las normas aprobadas por el Comité Ético de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid. Se tomaron todas las medidas posibles para reducir al mínimo el número de animales y su sufrimiento.

<sup>127</sup> Livett, B.G. (1984) Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol. Rev.* **64**:1103-1161.

<sup>128</sup> a) Moro M.A.; Lopez, M.G.; Gandía, L.; Michelena, P.; Garcia, A.G. (1990) Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal. Biochem.* **185**:243-248. b) Moro, M.A.; Garcia, A.G.; Langley, O.K. (1991) Characterization of two chromaffin cell populations isolated from bovine adrenal medulla. *J. Neurochem.* **57**:363-369.

<sup>129</sup> Wilson, S.P. (1987) Purification of adrenal chromaffin cells on Renografin gradients. *J. Neurosci. Methods.* **19**:163-171.

Para preparar las rodajas<sup>[130]</sup>, los animales fueron anestesiados por inyección intraperitoneal (i.p.) con pentobarbital sódico (60 mg·kg<sup>-1</sup>), decapitados, y cada cerebro se extrajo rápidamente del cráneo y se colocó en el tampón de disección fría de Krebs-bicarbonato que contiene: NaCl 120 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 mM, glucosa 11 mM y sacarosa 200 mM. Todas las soluciones se burbujearon previamente con carbógeno (95% de O<sub>2</sub> : 5% de CO<sub>2</sub>), al menos 45 min antes de la inmersión de los hipocampos, para garantizar la saturación de O<sub>2</sub> y un pH final de 7,4. Los hipocampos se diseccionaron transversalmente en rodajas de 350 µm de espesor con el equipo "*McIlwain tissue chopper*" para hacer cortes de tejidos. Se descartaron las tres rodajas de las porciones anteriores y posteriores de los hipocampos por ser muy pequeñas, mientras que el resto se trasladaron a un vial que contiene 3 ml de solución preincubación de Krebs-bicarbonato que contiene: NaCl 120 mM, KCl 2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,19 mM y glucosa 11 mM, se burbujearon con carbógeno a temperatura ambiente durante 30 min a 34 °C para recuperarse del trauma de los cortes; después de este tiempo, se retiró la solución de preincubación Krebs-bicarbonato y se adicionaron 3 ml de solución control de Krebs-bicarbonato, se burbujearon con carbógeno durante 30 min a 37 °C. Las rodajas se protegieron del burbujeo vigoroso mediante el uso de una malla semipermeable de nylon.

#### 4.3.5. - Determinación de la viabilidad celular mediante MTT

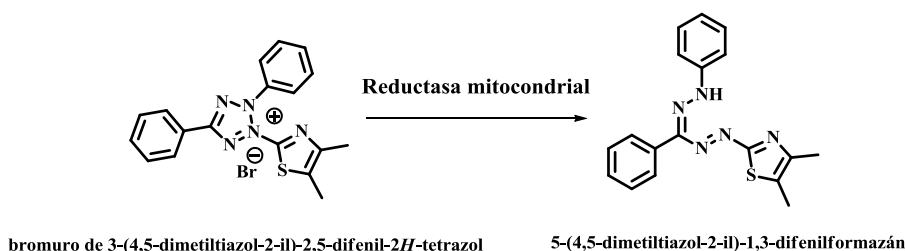
Este método fue desarrollado por Mossmann en 1983<sup>[131]</sup> y posteriormente modificado por Francois Denizot y Lang Rita en 1986<sup>[132]</sup>. Se

---

<sup>130</sup> Egea, J.; Rosa, A.O.; Sobrado, M.; Gandía, L.; López, M.G.; García, A.G. (2007) Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice. *Neuroscience*. **145**:866-872.

<sup>131</sup> Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*. **65**: 55-63.

fundamenta en la reducción metabólica del bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-2*H*-tetrazolio (MTT) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, en un precipitado de formazán de color azul, 5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazán (**figura 16**). Es un ensayo colorimétrico donde el valor de absorbancia obtenido a 540 nm es proporcional al número de células metabólicamente activas, capaces de reducir MTT. Ha sido ampliamente utilizado también para medir de forma indirecta la supervivencia y proliferación celular frente a diferentes estímulos<sup>[132]</sup>.



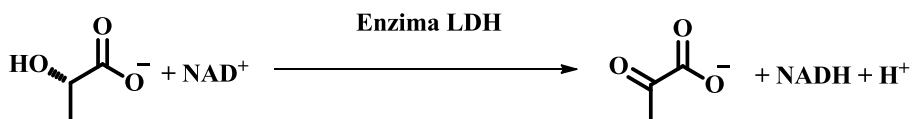
**Figura 16. - Reacción de reducción del MTT.** La sal de tetrazolio se transforma en un precipitado de formazán coloreado e insoluble, por la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa.

#### 4.3.6. - Determinación de la viabilidad celular mediante LDH

Este método de toxicidad celular se basa en la medición de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citoplasmática que cataliza la conversión del lactato a piruvato. Esta enzima se libera al medio de cultivo cuando las células pierden integridad de la membrana celular. En la actualidad, existen *kits* comerciales que permiten detectar la presencia de LDH por colorimetría. Es importante tener en cuenta que la enzima LDH está presente en sueros animales y que estos pueden confundir los resultados si se usan medios con suero. Por otro lado, el efecto de la posible proliferación celular se puede evitar si se miden los niveles de LDH liberado en el medio (LDH extracelular) y

<sup>132</sup> Denizot, F.; Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* **89**:271-277.

en el interior de las células (LDH intracelular) y expresando los resultados como porcentaje liberado respecto al total. El método se basa en el siguiente esquema de reacción:



**Figura 17. - Reacción de LDH.** La velocidad de formación de NADH es directamente proporcional a la actividad catalítica de la LDH y se determina midiendo el aumento de la absorbancia a 340 nm.

#### 4.4. - Evaluación del perfil neuroprotector de los derivados de CGP37157

La evaluación del perfil neuroprotector de los nuevos compuestos sintetizados se ha llevado a cabo con el cultivo primario de CCB, la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y y con rodajas de hipocampo de rata. Para los ensayos con CCB, estas se subcultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de siembra de  $5 \times 10^5$  células por pocillo. Para los ensayos con células SH-SY5Y, estas se subcultivaron en placas de 48 pocillos a una densidad de siembra de  $1 \times 10^5$  células por pocillo. Todas las células se utilizan en un número bajo de pases, de 5 a 13.

##### 4.4.1. - Evaluación del perfil neuroprotector frente a veratridina

Para analizar la capacidad neuroprotectora de los nuevos compuestos frente al estímulo tóxico de veratridina (VTD), se realizaron experimentos de viabilidad celular sometiendo a las células a VTD (20  $\mu\text{M}$ ) durante 24 h. Los nuevos compuestos sintetizados se preincubaron 24 h a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  antes de administrar VTD. Transcurrido ese tiempo, se coincubaron durante otras 24 h con VTD en medio sin SFB. Al final de cada experimento, la viabilidad celular se determinó con la prueba de LDH. Se recogió el medio de las muestras, 50  $\mu\text{l}$ , a las 24 h de coincubación expuestas a los diferentes

tratamientos farmacológicos utilizados para determinar la LDH extracelular, una indicación de la muerte celular<sup>[133]</sup>. La actividad de la LDH intracelular se midió en las células después del tratamiento con 10% de Tritón X-100 (LDH intracelular), se retiraron 50 µl del sobrenadante y se transfirió a una placa de 96 pocillos. A cada pocillo de la placa de 96 se le añadió 50 µl del kit de determinación de LDH. Dicha actividad se midió por espectrofotometría a 490 - 620 nm, utilizando un lector de microplacas (Labsystem iEMS reader MF; Labsystems, Helsinki, Finlandia). La actividad total de la LDH se define como la suma de las actividades intra y extracelulares. La LDH liberada se definió como el porcentaje de la extracelular en comparación con la actividad de la LDH total<sup>[134]</sup>.

#### 4.4.2. - Evaluación del perfil neuroprotector frente a 70 mM de K<sup>+</sup>

Para analizar la capacidad neuroprotectora de los nuevos compuestos frente a la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup>, se realizaron experimentos de viabilidad celular sometiendo a las células a alto K<sup>+</sup> (70 mM) durante 24 h. Los compuestos se expusieron a una concentración de 3 µM. Al final de cada experimento, la viabilidad celular se determinó con la prueba colorimétrica de MTT, añadido a las células a la concentración de 0,5 mg·ml<sup>-1</sup> durante 2 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo se retiró la solución y se adicionó 200 µl de DMSO a cada pocillo, se resuspendió el formazán y se transfirió a una placa de 96 pocillos, para la medición de la absorbancia a 540 nm, para ello se utilizó un lector de microplacas (FLUOstar Optima, BMG, Alemania).

<sup>133</sup> a) Koh, J.Y.; Choi, D.W. (1987) Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Methods*. **20**:83-90. b) Sobrado, M.; Roda, J.M.; López, M.G.; Egea, J.; García, A.G. (2004) Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* **365**:132-136.

<sup>134</sup> Cano-Abad, M.F.; López, M.G.; Hernández-Guijo, J.M.; Zapater, P.; Gandía, L.; Sánchez-García, P.; García, A.G. (1998) Effects of the neuroprotectant lubeluzole on the cytotoxic actions of veratridine, barium, ouabain and 6-hydroxydopamine in chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* **124**:1187-1196.



#### *4.4.3. - Evaluación en rodajas de hipocampo de rata frente a glutamato.*

La exposición de rodajas de hipocampo de rata a una alta concentración de Glu (1 mM) es considerado un modelo más fisiológico de sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Según la metodología descrita en el apartado anterior para la preparación de este modelo experimental una vez finalizado el periodo de incubación de 30 min a 37 °C, las rodajas se transfirieron en grupos de 4 por pocillo en placas de 6 pocillos (Corning, Madrid, España) que contenían 1 ml de solución Krebs-bicarbonato y 1 ml de EMEM/F12. Posteriormente, las rodajas se incubaron durante 30 min con los diferentes fármacos, seguido de un periodo de coincubación con Glu durante 4 h a 37 °C. Al final de este período, la viabilidad del tejido se estimó con el método de reducción de MTT transfiriendo cada rodaja individual a un pocillo de la placa transparente de 96 pocillos que contiene 200  $\mu\text{l}$  de la solución MTT 0,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  y se incubaron durante 30 min a 37 °C. Transcurrido este tiempo se retiró la solución y se adicionó 200  $\mu\text{l}$  de DMSO a cada pocillo; la placa se dejó bajo agitación continua durante 5 - 10 min para homogenizar la solución. Por último, se retiró la rodaja y se midió la absorbancia a 540 nm, utilizando un lector de microplacas (FLUOstar Optima, BMG, Alemania).

#### *4.4.4. - Evaluación del perfil neuroprotector frente a estrés oxidativo*

Para analizar la capacidad neuroprotectora de los nuevos compuestos frente al estrés oxidativo, se utilizó el cóctel tóxico Rotenona 30  $\mu\text{M}$ /Oligomicina A 10  $\mu\text{M}$  (Rot/Olig.A), el cual bloquea el complejo I y V, respectivamente, de la CTE mitocondrial. De esta manera, se interrumpe la síntesis de ATP. Este bloqueo de la respiración mitocondrial induce en la generación de gran cantidad de radicales libres y ROS.

Los nuevos compuestos sintetizados se preincubaron 24 h a una concentración de 0,3  $\mu\text{M}$  antes de administrar el coctel tóxico. Transcurrido ese tiempo, se coincubaron durante otras 24 h con el coctel tóxico. Al final de cada experimento, la viabilidad celular se determinó con la prueba colorimétrica de MTT, añadido a las células a la concentración de 0,5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  durante 2 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo se retiró la solución y se adicionó 200  $\mu\text{l}$  de DMSO a cada pocillo, se resuspendió el formazán y se transfirió a una placa de 96 pocillos, para medir la absorbancia a 540 nm, utilizando un lector de microplacas (FLUOstar Optima, BMG, Alemania).

#### 4.5. - Evaluación de los derivados de CGP37157 como bloqueantes del mNCX

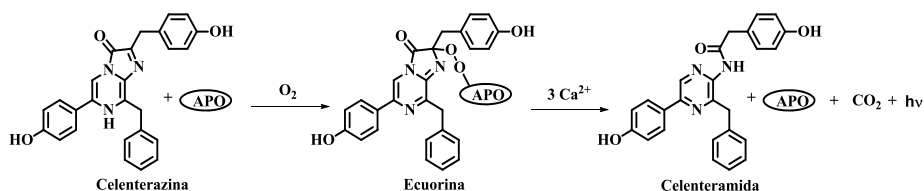
Para poder evaluar los compuestos sintetizados como bloqueantes del mNCX, se utilizaron experimentos de luminiscencia con la proteína bioluminiscente ecuorina. La ecuorina (AEQ) es una proteína bioluminiscente originalmente aislada de la medusa *Aequoria Victoria* que se ha utilizado históricamente como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ , dado que su capacidad para emitir luz es dependiente de este ión. A pesar de lo laborioso de su extracción desde la medusa para evitar el contacto con el  $\text{Ca}^{2+}$ , durante 30 años fue utilizada con la limitación de que sólo podía ser usada en células grandes, ya que debía ser microinyectada<sup>[135]</sup>. Debido a estas limitaciones, cayó en desuso hasta que, en 1985, se clonó el ADN de la AEQ<sup>[136]</sup>. La posibilidad de la expresión recombinante de la AEQ amplió el número de tipos celulares en que podía utilizarse a todos aquellos que podían ser transfectados, y no sólo a aquellos cuyo tamaño permitía la microinyección de la AEQ. Además, introdujo la posibilidad de dirigir la AEQ a compartimentos subcelulares, añadiendo las

<sup>135</sup> Rudolf, R.; Mongillo, M.; Rizzuto, R.; Pozzan, T. (2003) Looking forward to seeing calcium. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4:579-586.

<sup>136</sup> Inouye, S.; Noguchi, M.; Sakaki, Y.; Takagi, Y.; Miyata, T.; Iwanaga, S.; Miyata, T.; Tsuji, F.I. (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82:10:3154-3158.

secuencias de localización subcelular, lo que le dio un nuevo ímpetu a su uso como sensor de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>[137]</sup>.

La AEQ es una proteína formada por la apoAEQ y un grupo prostético, el luminóforo celenterazina. La apoAEQ está compuesta a su vez de 189 aminoácidos y presenta tres dominios E-F, estructuras características de sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , conocidos como manos de  $\text{Ca}^{2+}$ , con alta homología con los sitios de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  de la calmodulina bovina<sup>[134]</sup>. La emisión de luz por parte de la AEQ es dependiente de dos factores, uno es la presencia del grupo prostético celenterazina y el otro es la presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando tres iones  $\text{Ca}^{2+}$  se unen al complejo apoAEQ-celenterazina, el grupo prostético sufre una oxidación a celenteramida, concomitante con la liberación de una molécula de  $\text{CO}_2$  y la emisión de un fotón de luz a 466 nm (luz azul) (**figura 18**). Esta reacción es irreversible y por tanto, las moléculas de AEQ se consumen.



**Figura 18. - Reacción de la AEQ con iones  $\text{Ca}^{2+}$ .** En un primer paso, se une la celenterazina a la apoAEQ. Después, la unión de 3 iones de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadena la reacción irreversible de oxidación de la celenterazina con emisión de luz.

La señal de luminiscencia de la AEQ puede ser transformada en un valor de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]$ ). Para poder traducir los valores de luminiscencia en términos de  $[\text{Ca}^{2+}]$  se necesita conocer la luminiscencia total que puede emitir la muestra. Por eso, al finalizar cada experimento se perfunde una solución de lisis celular consistente en una concentración saturante de  $\text{Ca}^{2+}$

<sup>137</sup> Rizzuto, R.; Brini, M.; Murgia, M.; Pozzan, T. (1993) Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to  $\text{IP}_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*. **262**:744-747.

(10 mM) y 100  $\mu$ M de digitonina, a fin de consumir la AEQ remanente por completo.

#### *4.5.1. - Procedimiento experimental para la expresión y reconstitución de la AEQ en células HeLa*

Para los experimentos de AEQ, se sembraron las células en placas de 24 pocillos con cubreobjetos de vidrio de 13 mm de diámetro (Menzelglasser, Braunschweig, Alemania) a una densidad de  $8 \times 10^5$  células por pocillo. A las 24 h en cultivo, se transfectaron con AEQ. Los experimentos se realizaron a las 36 - 48 h de la transfección. Para la realización de este estudio se utilizó la AEQ mitocondrial mutada<sup>[138]</sup> (AEQ<sub>mit-mut</sub>) con capacidad para monitorizar  $[Ca^{2+}]_{mit}$  hasta 100  $\mu$ M. La AEQ<sub>mit-mut</sub> tiene en su posición 119 un aspartato en vez de alanina, que le permite reducir su afinidad por  $Ca^{2+}$ , así monitoriza rangos mayores de concentración que la forma nativa, desde 10 hasta 100  $\mu$ M. La AEQ<sub>mit-mut</sub> contiene una señal de localización mitocondrial, la subunidad VIII de la citocromo C oxidasa (COX VIII) humana, que le permite entrar en la matriz mitocondrial y, una vez allí, el polipéptido señal es retirado por proteasas, liberando la AEQ<sub>mit-mut</sub> a la matriz mitocondrial.

Para la introducción de los vectores en las células se utilizó un agente de transfección llamado Metafectene® (Biontex, München, Alemania), un lípido policationico capaz de formar liposomas que engloban el ADN, que está cargado negativamente. Estos complejos liposoma-ADN son endocitados al citosol al entrar en contacto con las células. Una vez allí, las bombas de protones de los endosomas bombean protones para disminuir el pH del endosoma y, por desequilibrio osmótico, liberan al citosol el contenido del mismo. Debido al ambiente ácido del endosoma en su fase tardía, la estructura de los liposomas se debilita debido a cambios en la carga del lípido, de forma

---

<sup>138</sup> Brini, M.; Pinton, P.; Pozzan, T.; Rizzuto, R. (1999) Targeted recombinant aequorins: Tools for monitoring  $[Ca^{2+}]$  in various compartments of a living cell. *Microsc. Res. Tech.* **46**:380-389.

que al romperse el endosoma se libera al citosol mayor cantidad de ADN libre. Con la entrada de la célula en división, el plásmido entra en el núcleo y la AEQ empieza a transcribirse y traducirse.

Tras la transfección, en la célula solo existe la apoproteína; hay que introducir la celenterazina, tanto nativa como mutada (Molecular Probes, Oregon, USA), para poder tener la proteína activa. Este proceso se conoce como reconstitución, y para ello basta con poner las células en presencia de una concentración de 5  $\mu\text{M}$  de celenterazina, nativa o mutada, durante 1:30 - 2:30 h previo al experimento, en una solución de Krebs-HEPES suplementada con 1% SFB y 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  a 37 °C. Para la realización del experimento, el cubreobjetos con las células cargadas con AEQ reconstituida se colocó en una cámara de perfusión construida al efecto, situada en íntimo contacto con un fotomultiplicador que se mantuvo en una cámara oscura. Dicho equipo fue situado en sitio oscuro para no perder señal, dado que la señal de bioluminiscencia emitida por la AEQ es muy leve. La cámara de perfusión se conectó con un sistema de electroválvulas de 6 vías, con el que a lo largo del experimento se perfundió a las células con distintas soluciones.

#### *4.5.2. - Evaluación de los compuestos en células HeLa intactas*

Una vez reconstituidas las células, se realizó la evaluación de los compuestos, a una concentración de 3  $\mu\text{M}$ , frente a un pulso de histamina. La solución básica extracelular de Krebs-HEPES para células HeLa contenía, NaCl 125 mM, KCl 5,0 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,0 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,0 mM, HEPES 20 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM, D-glucosa 5,50 mM, pH = 7,4. Los experimentos se finalizaron con una solución de concentración saturante de  $\text{CaCl}_2$ , de composición igual que la solución de Krebs-HEPES básica a la que se le aumentó el  $\text{CaCl}_2$  hasta 10 mM y se suplementó con 100  $\mu\text{M}$  de digitonina. Los protocolos que se llevaron a cabo se muestran en las siguientes figuras:

⇒ Protocolo I. Células control con Histamina 100  $\mu$ M.

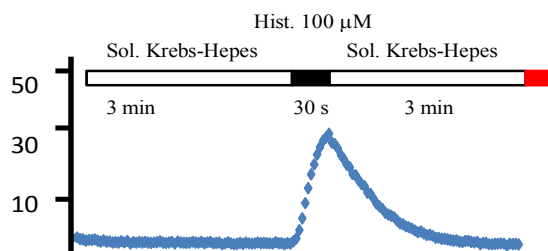


Figura 19. - Protocolo I. Células control sometidas a un pulso de 100  $\mu$ M de histamina.

⇒ Protocolo II: Cribado de los compuestos a 3  $\mu$ M.

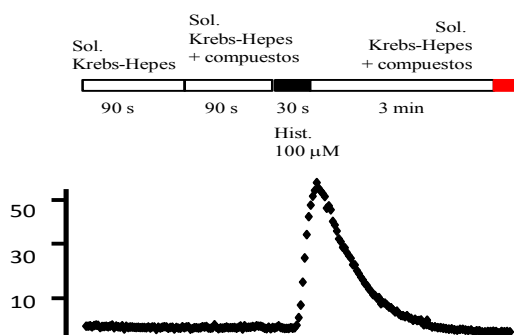


Figura 20. - Protocolo II. Cribado de los compuestos a 3  $\mu$ M frente a un pulso de 100  $\mu$ M de histamina.

#### 4.5.3. - Evaluación de los compuestos frente al bloqueo del mNCX en mitocondrias "in situ"

Para poder evaluar el efecto de bloqueo sobre mNCX, se realizaron experimentos de "mitocondria in situ" o de células permeabilizadas. Las condiciones experimentales que teníamos eran: (i) 10 mM  $\text{Na}^+$  que da lugar a la situación de máxima actividad mNCX (aclaramiento del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial); (ii) 0 mM  $\text{Na}^+$  situación de parada del mNCX (acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial); (iii) 10 mM  $\text{Na}^+$  en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos a evaluar, (condiciones intermedias de aclarado de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ ). Para ello las soluciones que se utilizaron fueron;

- **Solución 1 (S1):** Solución básica extracelular de Krebs-HEPES que contenía NaCl 125 mM, KCl 5,0 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,0 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,0 mM, HEPES 20 mM, *D*-glucosa 5,50 mM, pH = 7,4 complementada con EGTA 0,5 mM.
- **Solución 2 (S2):** Solución intracelular de permeabilización que contenía KCl 130 mM, NaCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,0 mM,  $\text{K}_3\text{HPO}_4$  1,0 mM, HEPES 20 mM, pH = 7,0 complementada con EGTA 0,5 mM, ATP 1 mM, ADP 20  $\mu\text{M}$ , Succinato 2 mM y digitonina 10  $\mu\text{M}$ .
- **Solución 3 (S3):** Solución intracelular que contenía KCl 130 mM, NaCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,0 mM,  $\text{K}_3\text{HPO}_4$  1,0 mM, HEPES 20 mM, pH = 7,0 complementada con ATP 1 mM, ADP 20  $\mu\text{M}$ , Succinato 2 mM.

Cuando se producía la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  por la mitocondria por medio del MCU, la solución que se perfundía era;

- **Solución 4 (S4):** solución intracelular **0 mM  $\text{Na}^+$**  que contenía KCl 140 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,0 mM,  $\text{K}_3\text{HPO}_4$  1,0 mM, HEPES 20 mM, pH = 7,0 complementada con  $\text{CaCl}_2$  5  $\mu\text{M}$ , ATP 1 mM, ADP 20  $\mu\text{M}$ , Succinato 2 mM.

Cuando se producían las condiciones de aclarado mitocondrial, por parte del mNCX, las soluciones que se perfundían eran;

- **Solución 5 (S5):** Solución intracelular **10 mM  $\text{Na}^+$** , para la situación de máxima actividad del mNCX, que contenía KCl 130 mM, NaCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,0 mM,  $\text{K}_3\text{HPO}_4$  1,0 mM, HEPES 20 mM, pH = 7,0 complementada con EGTA 0,5 mM, ATP 1 mM, ADP 20  $\mu\text{M}$ , Succinato 2 mM.
- **Solución 6 (S6):** Solución intracelular **0 mM  $\text{Na}^+$** , para la situación de parada del mNCX, que contenía KCl 140 mM,

MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM, K<sub>3</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 mM, HEPES 20 mM, pH = 7,0 complementada con EGTA 0,5 mM, ATP 1 mM, ADP 20 μM, Succinato 2 mM

Para evaluar el aclarado de Ca<sup>2+</sup><sub>mit</sub> del mNCX en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos a ensayar, la solución que se perfundió fue;

- **Solución 7 (S7):** Solución intracelular **10 mM Na<sup>+</sup>**, que contenía KCl 130 mM, NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,0 mM, K<sub>3</sub>HPO<sub>4</sub> 1,0 mM, HEPES 20 mM, pH = 7,0 complementada con EGTA 0,5 mM, ATP 1mM, ADP 20μM, Succinato 2mM y diferentes las concentraciones de los compuestos a evaluar.

Por último, todos los experimentos se finalizaron con una solución de concentración saturante de CaCl<sub>2</sub>, de composición igual que la solución de Krebs-HEPES básica a la que se le aumentó el CaCl<sub>2</sub> hasta 10 mM y se suplementó con 100 μM de digitonina. Los protocolos que se llevaron a cabo se muestran en las siguientes figuras:

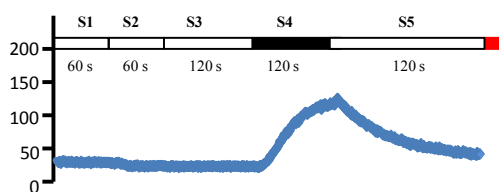


Figura 21. - Protocolo III. Experimento de permeabilización de células HeLa en condiciones de funcionamiento normal del mNCX.

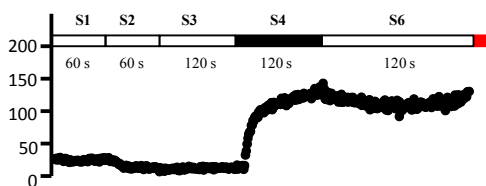
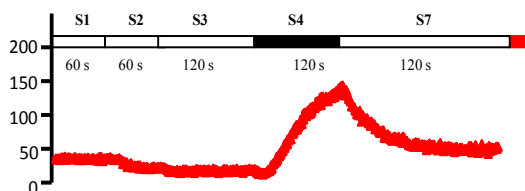


Figura 22. - Protocolo IV. Experimento de permeabilización de células HeLa en condiciones de parada del mNCX.





**Figura 23. - Protocolo V. Experimento de permeabilización de células HeLa en condiciones de funcionamiento normal de mNCX en presencia de concentraciones crecientes de compuesto.**

#### **4.6. - Análisis estadístico**

Todos los datos presentados son resultado de al menos tres cultivos independientes por triplicado. Los valores son presentados como las medias  $\pm$  error estándar. Las diferencias estadísticas entre los diferentes grupos fueron determinadas mediante un análisis de la varianza “one-way ANOVA” seguido de un análisis post hoc Newman-Keuls. El nivel de significancia estadística aceptado fue  $p < 0,05$ .

#### 4.7. - Bibliografía

- [122] Tidwell, T.T. (2001) Wilhelm Schlenk: The Man Behind the Flask. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**:331-337.
- [123] Armarego, W.L.F.; Chai, C.L.L. (2009) Purification of Laboratory Chemicals, *Pergamom Press*: Oxford.
- [124] Biedler, J.L.; Roffler-Tarlov, S.; Schachner, M.; Freedman, L.S. (1978) Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Res.* **38**:3751-3757.
- [125] Ross, R.A.; Spengler, B.A.; Biedler, J.L. (1983) Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **71**:741-747.
- [126] Macville, M.; Schröck, E.; Padilla-Nash, H. (1999) Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.* **59**:1:141-50.
- [127] Livett, B.G. (1984) Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol. Rev.* **64**:1103-1161.
- [128] a) Moro M.A.; Lopez, M.G.; Gandía, L.; Michelena, P.; Garcia, A.G. (1990) Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal. Biochem.* **185**:243-248. b) Moro, M.A.; Garcia, A.G.; Langley, O.K. (1991) Characterization of two chromaffin cell populations isolated from bovine adrenal medulla. *J. Neurochem.* **57**:363-369.
- [129] Wilson, S.P. (1987) Purification of adrenal chromaffin cells on Renografin gradients. *J. Neurosci. Methods.* **19**:163-171.
- [130] Egea, J.; Rosa, A.O.; Sobrado, M.; Gandía, L.; López, M.G.; García, A.G. (2007) Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice. *Neuroscience.* **145**:866-872.
- [131] Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
- [132] Denizot, F.; Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* **89**:271-277.

- [133] a) Koh, J.Y.; Choi, D.W. (1987) Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Methods.* **20**:83-90. b) Sobrado, M.; Roda, J.M.; López, M.G.; Egea, J.; García, A.G. (2004) Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* **365**:132-136.
- [134] Cano-Abad, M.F.; López, M.G.; Hernández-Guijo, J.M.; Zapater, P.; Gandía, L.; Sánchez-García, P.; García, A.G. (1998) Effects of the neuroprotectant lubeluzole on the cytotoxic actions of veratridine, barium, ouabain and 6-hydroxydopamine in chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* **124**:1187-1196.
- [135] Rudolf, R.; Mongillo, M.; Rizzuto, R.; Pozzan, T. (2003) Looking forward to seeing calcium. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**:579-586.
- [136] Inouye, S.; Noguchi, M.; Sakaki, Y.; Takagi, Y.; Miyata, T.; Iwanaga, S.; Miyata, T.; Tsuji, F.I. (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:10:3154-3158.
- [137] Rizzuto, R.; Brini, M.; Murgia, M.; Pozzan, T. (1993) Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to  $\text{IP}_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* **262**:744-747.
- [138] Brini, M.; Pinton, P.; Pozzan, T.; Rizzuto, R. (1999) Targeted recombinant aequorins: Tools for monitoring  $[\text{Ca}^{2+}]$  in various compartments of a living cell. *Microsc. Res. Tech.* **46**:380-389.



## 5. - Resultados y discusión

---

<b>5.1. - Síntesis de 4,1-benzotiazepinas análogas a CGP37157</b>	<b>141</b>
5.1.1. - <i>Evaluación de la síntesis</i>	141
5.1.2. - <i>Caracterización analítica</i>	146
5.1.3. - <i>Caracterización estructural</i>	146
5.1.3.1. - <i>Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (<sup>1</sup>H-RMN)</i>	147
5.1.3.2. - <i>Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (<sup>13</sup>C-RMN)</i>	148
5.1.3.3. - <i>Espectroscopía de Infrarrojos</i>	149
5.1.3.4. - <i>Espectrometría de Masas con la técnica de Electrospray (APIES<sup>+</sup>)</i>	150
<b>5.2. - Síntesis de 4,1-piridotiazepinas análogas a CGP37157</b>	<b>150</b>
5.2.1. - <i>Evaluación de la síntesis</i>	150
5.2.2. - <i>Caracterización analítica</i>	155
5.2.3. - <i>Caracterización estructural</i>	155
5.2.3.1. - <i>Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (<sup>1</sup>H-RMN)</i>	155
5.2.3.2. - <i>Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (<sup>13</sup>C-RMN)</i>	158
5.2.3.3. - <i>Espectroscopía de Infrarrojos</i>	158
5.2.3.4. - <i>Espectrometría de Masas con la técnica de Electrospray (APIES<sup>+</sup>)</i>	159
<b>5.3. - Evaluación del perfil neuroprotector de los derivados de CGP37157</b>	<b>159</b>
5.3.1. - <i>Evaluación del perfil neuroprotector frente a veratridina</i>	159
5.3.1.1. - <i>Evaluación de los derivados bencénicos (15-25)</i>	160
5.3.1.2. - <i>Evaluación de los derivados piridínicos (59-69)</i>	164
5.3.2. - <i>Evaluación del perfil neuroprotector frente a 70 mM de K<sup>+</sup></i>	165
5.3.2.1. - <i>Evaluación de los derivados bencénicos (15-25)</i>	167
5.3.2.2. - <i>Evaluación de los derivados piridínicos (59-69)</i>	168
5.3.3. - <i>Evaluación en rodajas de hipocampo de rata frente a glutamato</i>	170
5.3.3.1. - <i>Evaluación de los derivados bencénicos (15-25)</i>	171
5.3.3.2. - <i>Evaluación de los derivados piridínicos (59-69)</i>	173

5.3.4. - <i>Evaluación del perfil neuroprotector frente a estrés oxidativo</i>	175
5.3.4.1. - <i>Evaluación de los derivados bencénicos (15-25)</i>	175
5.3.4.2. - <i>Evaluación de los derivados piridínicos (59-69)</i>	177
<b>5.4. - Evaluación de los derivados de CGP37157 como bloqueantes del mNCX</b>	<b>178</b>
5.4.1. - <i>Evaluación de los compuestos en células HeLa intactas</i>	178
5.4.1.1. - <i>Evaluación de los derivados bencénicos (15-25)</i>	182
5.4.1.2. - <i>Evaluación de los derivados piridínicos (59-69)</i>	184
5.4.2. - <i>Evaluación de los compuestos frente al bloqueo del mNCX en mitocondrias "in situ"</i>	185
5.4.2.1. - <i>Evaluación del derivado bencénico (23)</i>	189
5.4.2.2. - <i>Evaluación del derivado piridínico (65)</i>	191
<b>5.5. - Bibliografía</b>	<b>197</b>

## 5. - Resultados y Discusión

### 5.1. - Síntesis de 4,1-benzotiazepinas análogas a CGP37157

#### 5.1.1. - Evaluación de la síntesis

Como se ha comentado en la Introducción, hay pocos métodos sintéticos descritos para 4,1-benzotiazepinas. Para la síntesis de los derivados de **CGP37157**, nos basamos en la metodología previamente descrita por Pei y colaboradores<sup>[83]</sup>. El estudio retrosintético para la molécula cabeza de serie **CGP37157**, sería de la siguiente manera:

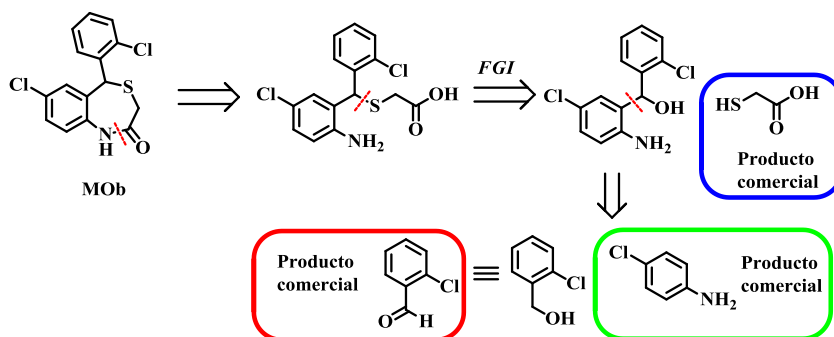


Figura 24. - Estudio retrosintético de CGP37157.

Partiendo de la molécula objetivo (MOB) **CGP37157**, la primera desconexión sería por el grupo amida, resultando de esta desconexión los grupos funcionales responsables de obtener sintéticamente dicho grupo, (grupo ácido carboxílico y grupo amina). Dado que ese fragmento sintético no es comercial, el estudio retrosintético sigue por el tioéter, que lleva a la operación retrosintética de interconversión de grupo funcional (FGI, por sus siglas en inglés, "*Functional Group Interchange*"), mediante la cual obtenemos el primer producto comercial, el ácido tioglicólico. El otro fragmento retrosintético, o sintón, no es comercial, por lo que se sigue con el proceso de retrosíntesis. La última desconexión que se puede realizar es la contigua al carbono alcohólico

de la molécula. Esta desconexión origina los dos últimos sintones posibles, aportando los productos de partida comerciales para la realización de los derivados propuestos. El objetivo sintético de esta memoria consiste en la preparación de derivados de **CGP37157** a partir de la modificación de los sustituyentes del anillo de fenilo en C5, así como del cambio del benceno fusionado por piridina.

La ruta sintética propuesta consiste en una reacción de *o*-litiación y adición nucleófila a aldehídos aromáticos<sup>[83,139]</sup> para la primera reacción, seguida de una reacción de *S*-alquilación y ciclación intramolecular para generar el anillo de 7 miembros propio de las benzotiazepinas<sup>[83]</sup>. El esquema sintético para la obtención de los derivados bencénicos es el siguiente:

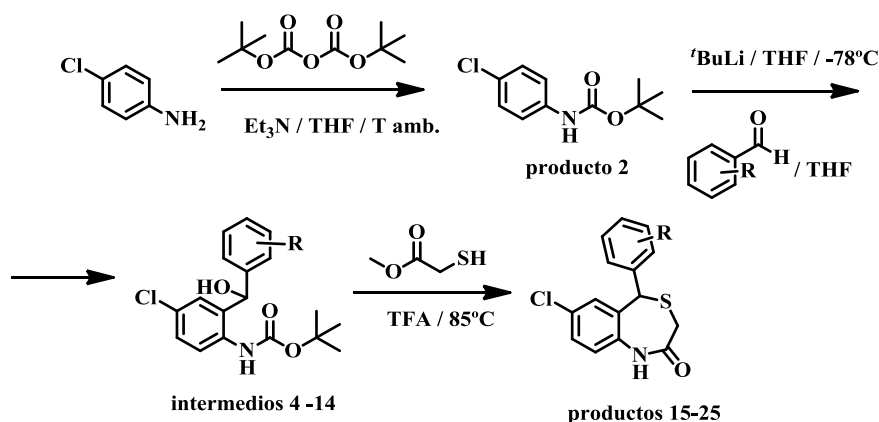


Figura 25. - Esquema de síntesis utilizada para generar nuevos derivados de CGP37157.

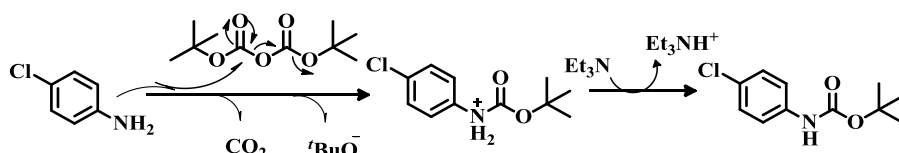
La protección de la amina, necesaria para que proceda la *o*-litiación, se lleva a cabo mediante la generación de un carbamato con dicarbonato de ditertbutilo ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ), ya que la conversión de aminas en amidas como grupo protector puede, a priori, ser una buena solución, pero su hidrólisis hay que efectuarla en condiciones de alta basicidad, o acidez y temperatura que podrían

<sup>139</sup> Abdessamad, A.; Schmidt, F.; Sarr, M.; Decaudin, D.; Florent, J.C.; Johannes, L. (2008) Synthesis and Properties of a Mitochondrial Peripheral Benzodiazepine Receptor Conjugate. *Chem. Med. Chem.* **3**:1687-1695.



afectar a otros grupos funcionales presentes en la estructura<sup>[140]</sup>. Se obtiene el producto **2**, lentamente (48 h), pero con buenos rendimientos (98%). El producto **2** se obtiene puro sin necesidad de realizar purificación por cromatografía.

El mecanismo de reacción por medio de la cual ocurre la protección es por medio de una A<sub>N</sub> (adición nucleófila) (**figura 26**):



**Figura 26.** - Mecanismo de protección de 4-cloroanilina mediante el grupo protector Boc<sub>2</sub>O.

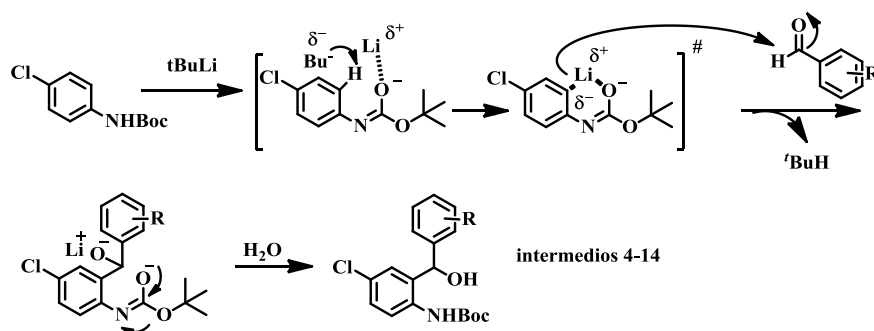
El producto **2** se somete a la reacción de *o*-litiación. En condiciones anhidras, esta reacción aprovecha el efecto ortodirigente del carbamato generado en **2** para desprotonar la posición orto del anillo de benceno con la base 'BuLi<sup>[141]</sup> (**figura 27**). La importancia del grupo carbamato, RNHCOOR' en la reacción de *o*-litiación deriva de su naturaleza anfótera, el átomo de oxígeno en el grupo carbonilo de una amida tiene un carácter básico, y además el grupo carbamato es un aceptor de electrones, por lo que acidifica los protones del anillo de benceno<sup>[142]</sup>. En la *o*-litiación se produce una coordinación entre el reactivo litiado y el heteroátomo del grupo dirigente, produciendo un aumento de la reactividad en el sitio de coordinación, y por lo tanto se puede dirigir la regioselectividad de la reacción<sup>[142]</sup>. Debido a esa coordinación con el heteroátomo se forma un intermedio cíclico facilitando la desprotonación del H bencénico en posición *orto* al grupo carbamato dirigente por parte de la base. Este grupo ortodirigente precisa de tiempos largos de reacción y temperaturas

<sup>140</sup> Smith, M.B. (2010) Organic Synthesis (Third Edition) Chapter 7, Protecting Groups, *Academic Press. Elsevier*. pages 587-622.

<sup>141</sup> Gschwend, H.W.; Rodriguez, H.R. (2005) Heteroatom-Facilitated Lithiations *Organic Reactions*. **26**:1:1-360.

<sup>142</sup> Clayden, J. (2002) Organolithiums: Selectivity for Synthesis. *Ed. Pergamon*.

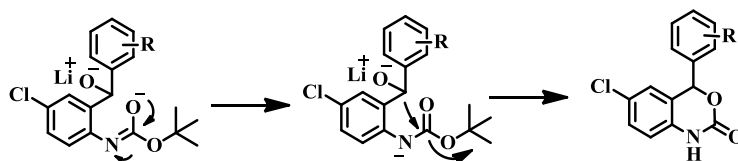
elevadas para poder facilitar la litiación. La adición de  $t\text{BuLi}$  debe hacerse a  $-78^\circ\text{C}$ , consiguiendo controlar la reacción cinéticamente. En un primer paso,  $t\text{BuLi}$  nos da una solución incolora, y a partir de la adición de 1,5 equivalentes la solución adquiere una tonalidad amarilla, indicativa de que ha terminado de desprotonar el grupo NH y ha comenzado la *o*-litiación. Finalizada la adición, se deja la reacción 15 min a  $-78^\circ\text{C}$  para estabilizarla y posteriormente se aumenta la temperatura hasta  $-20^\circ\text{C}$ , facilitando así el proceso de *o*-litiación<sup>[83,141,142]</sup>. Se mantiene la reacción a  $-20^\circ\text{C}$  durante 120 minutos, apreciándose como la solución adquiere una coloración anaranjada durante este tiempo, señal de que la reacción de *o*-litiación se ha completado. En este momento es necesario volver a bajar la temperatura a  $-78^\circ\text{C}$  para añadir gota a gota el aldehído correspondiente. Se produce la reacción de  $A_N$  del C nucleófilo al grupo carbonilo. El proceso se monitoriza por TLC para seguir el curso de la reacción, cuando se corrobora que la reacción no evoluciona más se adiciona  $\text{H}_2\text{O}$  (15 ml), que interrumpe la reacción y destruye el posible exceso de producto litiado sobrante. El mecanismo de reacción por medio de la cual ocurre es  $A_N$  (**figura 27**);



**Figura 27. - Mecanismo de *o*-litiación y  $A_N$  sobre grupo carbonilo para conseguir los intermedios 4-14.**

El control de tiempo y temperatura de la reacción es esencial para evitar la formación de productos secundarios debido a la excesiva capacidad nucleófila del intermedio litiado. Se puede producir una reacción de ciclación intramolecular una vez que se ha producido la reacción de  $A_N$  sobre el C del

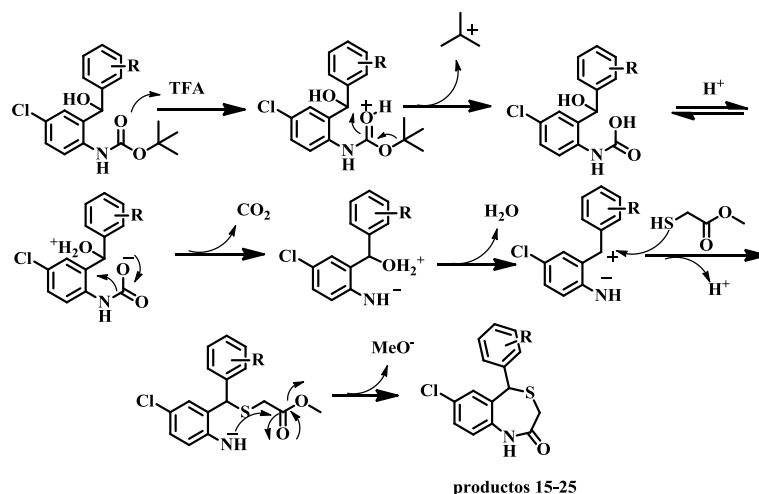
grupo carbonilo del arilaldehído obteniéndose un producto intermedio ciclado que puede reducir los rendimientos en este paso sintético<sup>[83,142]</sup>.



**Figura 28.** - Mecanismo de ciclación intramolecular para producir los posibles productos secundarios.

Siguiendo el “*work-up*” descrito en la parte experimental (apartado 4.2.2.1), el producto obtenido se purifica por columna cromatográfica. Este producto es el intermedio utilizado en la siguiente etapa donde sufre una reacción “*one-pot*”, tres pasos de reacción diferentes: una *S*-alquilación, una desprotección del grupo protector de amina y una reacción de lactamización.

Los intermedios **4-14**, bajo las condiciones descritas en la parte experimental (apartado 4.2.2.2), sufren una reacción de sustitución nucleófila que preferentemente va por un mecanismo unimolecular ( $S_N1$ ) con tioglicolato de metilo en TFA a 85 °C. En estas condiciones, se produce la salida del grupo protector Boc, permitiendo que el  $NH^+$  resultante ataque al grupo éster del tioglicolato de metilo formando por lactamización el ciclo de benzotiazepina. El “*work-up*” descrito en la parte experimental y el proceso de purificación por columna cromatográfica da lugar a los productos **15-25**. El mecanismo de reacción por medio de la cual ocurre la reacción se describe en la **figura 29**;



**Figura 29. - Mecanismo del proceso "one-pot", desprotección de grupo Boc, S-Alquilación y reacción de lactamización intramolecular.**

### 5.1.2. - Caracterización analítica

El análisis químico elemental se basa en la oxidación total de la muestra por una combustión instantánea y completa que transforma la muestra en productos de combustión ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  y  $\text{SO}_2$ ), que mediante un gas portador (He) son arrastrados hasta unos sensores individuales y selectivos para estos productos por celdas de infrarrojos que los miden. Posteriormente se mide el Nitrógeno por termoconductividad diferencial. Las diferencias encontradas no superan el 0,4%, por lo que se puede considerar que todos los compuestos finales, **15-25**, presentan la suficiente pureza para ser evaluados biológicamente.

### 5.1.3. - Caracterización estructural

Para corroborar la obtención de los productos deseados, se ha llevado a cabo la caracterización estructural de todos los compuestos por medio de técnicas espectroscópicas. Todos los compuestos han mostrado respuestas espectrales asignables a su estructura química. Estos datos aparecen en el procedimiento experimental de esta memoria. La caracterización

espectroscópica por  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y FTIR para los compuestos **2**, **12** y **23** se encuentran recogidos en el apartado de Anexos.

#### 5.1.3.1. - Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H}$ -RMN)

Existen una serie de señales de  $^1\text{H}$ -RMN características de la obtención de los intermedios **4-14**. La señal de  $\delta$  para metinos sin sustituir suelen aparecer a campos altos, tiene un  $\delta$  menor, su valor suele ser 1,4-1,7 ppm. En nuestra molécula, el CH se encuentra trisustituido, con dos grupos Ph, y un grupo OH. La presencia de un átomo electronegativo produce un descenso de la densidad electrónica alrededor del  $^1\text{H}$  a causa del efecto inductivo. Dicho  $^1\text{H}$  está desprotegido y absorbe a campo bajo, por lo que su  $\delta$  será mayor. Aparte del efecto inductivo producido por el grupo OH, el  $^1\text{H}$  del grupo CH va a presentar también efecto anisotrópico por parte de los anillos fenilos a los cuales se encuentra unido. Este efecto anisotrópico hará que ese  $^1\text{H}$  absorba a campo bajo, por lo que su  $\delta$  será mayor. Debido a que el efecto inductivo y anisotrópico son acumulativos, se puede justificar los valores de  $\delta$  que se obtienen para esa señal en los intermedios **4-14**. Estos valores aparecen reflejados en la **tabla 6**.

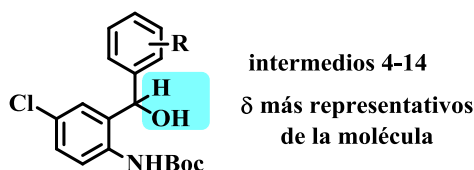


Figura 30. - Estructura química para los intermedios 4-14, y señal más destacable en  $^1\text{H}$ -RMN.

Tabla 6. -  $\delta$  para la señal CH de los intermedios 4-14 en  $^1\text{H}$ -RMN

	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
$\delta$ CH											
$\delta$ (ppm)	6,01	6,15	6,15	6,23	6,50	6,10	5,83	5,80	6,10	5,83	6,10

En los productos **15-25**, este CH presenta un entorno parecido, por lo que su  $\delta$  no varía considerablemente respecto a sus precursores. En el caso de las señales pertenecientes al grupo CH<sub>2</sub> del ciclo de benzotiazepinas, su señal espectral debería corresponder a un singlete, debido a que esos <sup>1</sup>H deberían ser monotópicos (<sup>1</sup>H equivalentes entre sí), pero al encontrarse ese CH<sub>2</sub> en un sistema cíclico, esos <sup>1</sup>H se convierten en diastereotópicos (no equivalentes entre sí), esto es debido a que dos núcleos con iguales conectividades (topología) en la molécula, pero no intercambiables mediante operaciones de simetría, resultan no equivalentes<sup>[143]</sup>. En base a esto, esta señal espectral se va a encontrar desdoblada y presentando multiplicidad. Así es indicativa de la formación del ciclo de benzotiazepina siendo su *J* entorno a 18-12 Hz.

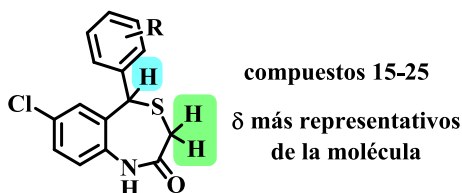


Figura 31. - Estructura química para los compuestos 15-25, y señal más destacable en <sup>1</sup>H-RMN.

Tabla 7. -  $\delta$  (ppm) para la señal CH y CH<sub>2</sub> de los compuestos 15-25 en <sup>1</sup>H-RMN

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
$\delta$ CH											
$\delta$	5,90	6,11	6,13	6,17	6,69	6,14	5,61	5,65	6,08	5,61	6,06
$\delta$ CH <sub>2</sub>											
$\delta$	3,33/ 3,00	3,33/ 3,00	3,33/ 3,00	3,40/ 3,00	3,60/ 3,00	3,33/ 3,00	3,30/ 3,00	3,31/ 3,00	3,36/ 3,00	3,30/ 3,00	3,27/ 3,03

#### 5.1.3.2. - Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono (<sup>13</sup>C-RMN)

El registro de <sup>13</sup>C-RMN se ha realizado en un equipo Bruker DRX-500MHz. Se observan dos señales a campo alto, indicativas de carbonos

<sup>143</sup> Balci, M. (2005) Basic <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy, 1st Edition. Elsevier Science.

alifáticos, correspondientes a  $-C(3)H_2-$  y  $-C(5)H-$ . Las señales aparecidas a campo bajo, entorno a 135 ppm y 124 ppm, pertenecen a los carbonos del anillo de benceno. La señal que aparece entorno a 170 ppm pertenece al carbono del grupo carbonilo.

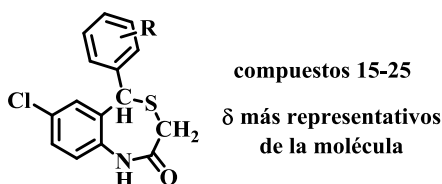


Figura 32. - Estructura química para los compuestos 15-25, y señal más destacable en  $^{13}C$ -RMN.

Tabla 8. -  $\delta$  para la señal  $-C(3)-H_2$  y  $-C(5)-H$  de los compuestos 15-25 en  $^{13}C$ -RMN

	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
$\delta C(3)H_2$											
$\delta$ (ppm)	36,3	30,9	31,4	31,7	30,9	31,6	31,1	30,9	31,7	30,9	30,9
$\delta C(5)H$											
$\delta$ (ppm)	44,4	45,7	43,6	42,3	45,7	40,0	45,6	46,3	42,6	45,7	45,7

#### 5.1.3.3. - Espectroscopía de Infrarrojos (FTIR)

El registro de FTIR se ha realizado en un Espectrómetro FT-IR Bruker IFS60v. En el registro de FTIR obtenido para el compuesto **23** se muestran las señales características de una benzotiazepina, siendo las más importantes la banda de vibración ( $\nu_{NH(st)}$ ), indicativa de un grupo NHCO entorno a  $3500\text{ cm}^{-1}$ , las bandas de vibración de los CH aromáticos de los anillos de benceno, ( $\nu_{CHaromáticos(st)}$ ), la banda de vibración de carbonilo ( $\nu_{CO(st)}$ ) indicativa de la presencia de un grupo CO en la molécula, alrededor de  $1740\text{ cm}^{-1}$  y la banda de flexión del grupo NHCO, ( $\delta_{NH(st)}$ ) sobre  $1490\text{ cm}^{-1}$ .

#### 5.1.3.4. - Espectrometría de Masas con la técnica de Electrospray (APIES<sup>+</sup>)

Los compuestos **15-25** fueron analizados mediante la técnica de ionización por electrospray en modo de detección de iones positivos. Se utilizó un espectrómetro de masas con analizador híbrido QTOF modelo QSTAR pulsar i de la casa comercial Applied Biosystems. En todos los espectros se detecta el pico esperado a  $m/z$ , correspondiente a un ion de tipo  $[M+H]^+$ , el cual es el pico de la molécula sin fragmentación ionizada, típico de la técnica de electrospray. También se detectan los aductos  $[M+Na]^+$ ,  $[2M+H]^+$  y  $[2M+Na]^+$ . Además, la distribución isotópica del ión  $[M+H]^+$  refleja la presencia de átomos halógenos en la estructura del compuesto.

### 5.2. - Síntesis de 4,1-piridotiazepinas análogas a CGP37157

#### 5.2.1. - Evaluación de la síntesis

Como se comentó en la Introducción, la modificación de la estructura conduce a la modulación de su actividad farmacológica. Un nuevo abordaje que realizamos sobre estos derivados ha sido cambiar el producto de partida 4-cloroanilina por el 2-amino-5-cloropiridina, para así tener un grupo heteroaromático en el esqueleto principal de la molécula, con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas de la molécula debido a que el anillo de piridina mejora la polaridad del compuesto al ser este más polar. El abordaje retrosintético de la MOB se muestra en la **figura 33**, análogo al descrito para la **figura 24**, excepto por la variación del producto de partida.



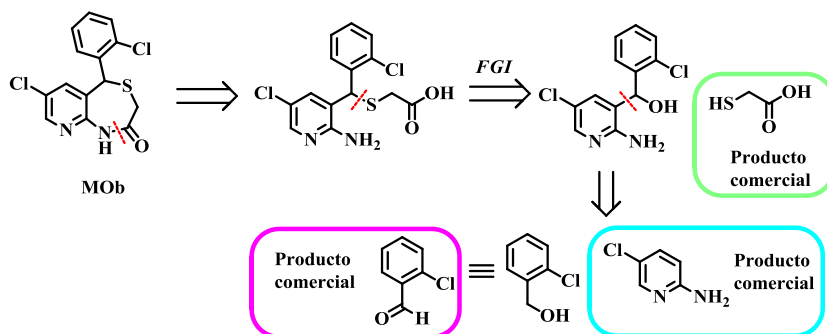


Figura 33. - Estudio retrosintético para la familia de derivados piridínicos de CGP37157.

La síntesis propuesta es parecida, reacción de *o*-litiación<sup>[142,144]</sup> para la primera reacción, seguida de una reacción de desprotección del grupo protector pivaloilo. A continuación procede una reacción de *S*-alquilación para obtener el derivado *S*-alquilado abierto y posteriormente para generar el compuesto final una reacción de ciclación intramolecular. Cabe destacar que cuando se intentó la protección de la piridina con  $\text{Boc}_2\text{O}$ , hubo problemas en el paso de extracción, y bajo rendimiento, por lo que se decidió el uso de cloruro de pivaloilo<sup>[140,144]</sup>. Además, la piridina protegida con  $\text{Boc}_2\text{O}$  no condujo a los intermedios del tipo **26-36**. El esquema sintético para la obtención de los derivados piridínicos es el siguiente;

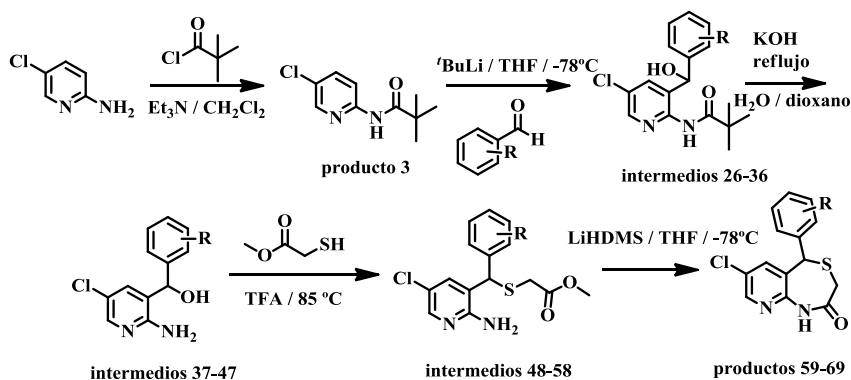
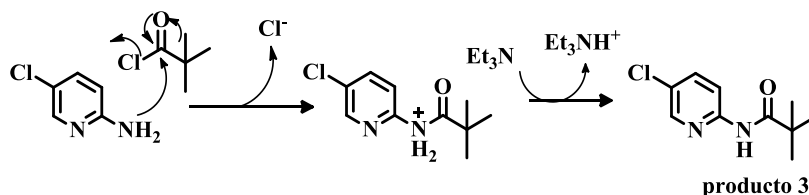


Figura 34. - Esquema general de síntesis utilizada para los derivados piridínicos de CGP37157.

<sup>144</sup> Turner, J.A. (1983) Regiospecific Electrophilic Substitution of Aminopyridines: Ortho Lithiation of 2-, 3-, and 4-(Pivaloylamino)pyridines. *J. Org. Chem.* **48**:3401-3408.

La reacción de protección del grupo  $\text{NH}_2$  de la 2-amino-5-cloropiridina con cloruro de pivaloilo transcurre más rápidamente que la protección con  $\text{Boc}_2\text{O}$  (2 h) y con buenos rendimientos (98%). El producto **3** es obtenido puro sin necesidad de realizar purificación por cromatografía. El mecanismo de reacción para la obtención de este producto se muestra en la **figura 35**;



**Figura 35.** - Mecanismo de protección de 2-amino-5-cloropiridina mediante el grupo protector cloruro de pivaloilo.

El producto **3** es sometido a la reacción de *o*-litiación, pues el grupo *t*-butylcarbamoil también es ortodirigente<sup>[142]</sup> y el *t*BuLi puede desprotonar la posición 3 del anillo de piridina. La adición de *t*BuLi se realiza en las mismas condiciones. Finalizada la adición, se deja 15 min a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posteriormente subir la temperatura a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 - 4 h. Así, se completa la reacción de *o*-litiación sobre la posición 3 del anillo de piridina. Transcurrido este tiempo, se baja la temperatura a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  para añadir gota a gota el arilaldehído correspondiente, produciéndose la reacción de  $\text{A}_{\text{N}}$  del C nucleófilo al grupo carbonilo. La reacción se deja que alcance lentamente temperatura ambiente y se monitoriza por TLC. Cuando se corrobora que la reacción no evoluciona más, se adiciona  $\text{H}_2\text{O}$  (15 ml), que interrumpe la reacción y destruye el posible exceso de producto litiado sobrante. El mecanismo de reacción para la obtención de los intermedios **26-36** se muestra en la **figura 36**;

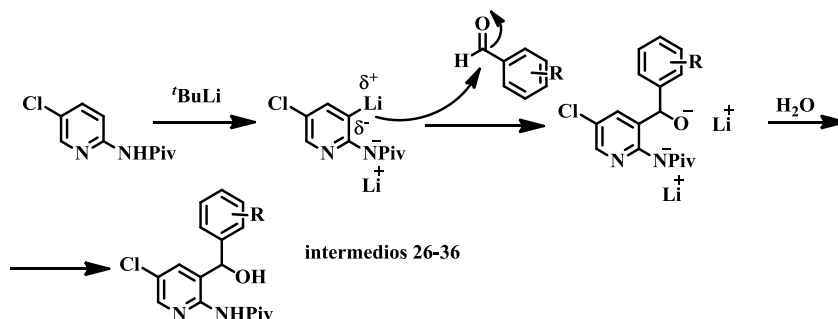


Figura 36. - Mecanismo de *o*-litiación y  $A_N$  sobre grupo carbonilo para conseguir los intermedios 26-36.

Siguiendo el “*work-up*” descrito en la parte experimental (apartado 4.2.3.1), el producto obtenido es purificado por columna cromatográfica. En el siguiente paso, el intermedio sufre una reacción de desprotección del grupo pivaloilo para poder liberar al grupo  $\text{NH}_2$  en medio básico ( $\text{KOH}$  2 M)<sup>[140]</sup>. La desprotección de este grupo debe de realizarse en este paso debido a que el grupo pivaloilo, al contrario que el grupo Boc, resiste condiciones ácidas y solo se puede eliminar en condiciones básicas, debido a eso no se puede realizar la etapa “*one-pot*” como con sus homólogos bencénicos y es necesario la introducción de una etapa previa de desprotección. Esta reacción es generalmente cuantitativa y no es necesaria la purificación del intermedio obtenido. El mecanismo de reacción para la obtención de los intermedios 37-47 se muestra en la **figura 37**;

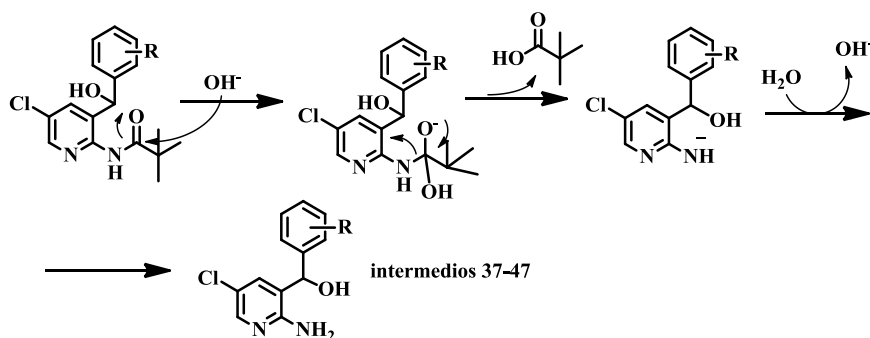
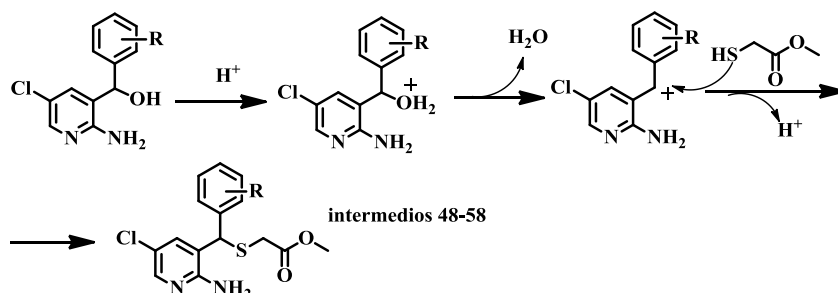


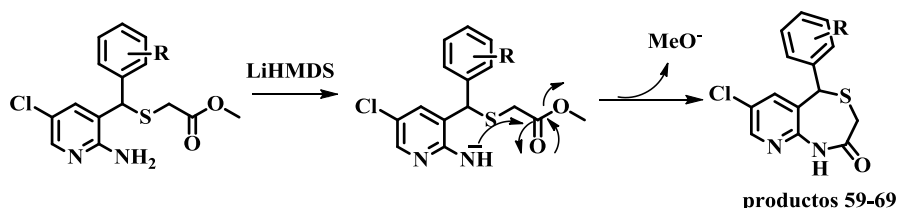
Figura 37. - Mecanismo de desprotección en medio básico del grupo pivaloilo para conseguir los intermedios 37-47.

Los intermedios **37-47** desprotegidos son sometidos a *S*-Alquilación mediante reacción  $S_N1$  en medio ácido débil. Siguiendo el “*work-up*” descrito en la parte experimental (apartado 4.2.3.3) y posterior purificación se obtienen los intermedios **48-58**. El mecanismo de reacción para la obtención de los intermedios **48-58** se muestra en la **figura 38**;



**Figura 38.** - Mecanismo de  $S_N1$  en medio ácido débil para conseguir los intermedios **48-58**.

La última etapa de la reacción es la ciclación intramolecular para la obtención del derivado piridotiazepina. Mediante el reactivo de litio LiHMDS se produce la sustracción de un H del grupo  $NH_2$ , generándose amiduro que ataca al grupo carbonilo del éster, produciéndose la ciclación intramolecular. Siguiendo el “*work-up*” descrito en la parte experimental (apartado 4.2.3.4), obtenemos el producto final deseado que necesitará de una etapa de purificación con gel de sílice desactivada con  $NH_3$ .



**Figura 39.** - Mecanismo ciclación intramolecular por medio de un reactivo litiado para conseguir los productos **59-69**.

### 5.2.2. - Caracterización analítica

En cuanto al análisis químico elemental, las diferencias encontradas no superan el 0,4%, por lo que se puede considerar que todos los compuestos finales, **59-69**, presentan la suficiente pureza para ser evaluados biológicamente.

### 5.2.3. - Caracterización estructural

Para corroborar la obtención de los productos deseados, se ha llevado a cabo la caracterización estructural de todos los compuestos por medio de técnicas espectroscópicas. Todos los compuestos han mostrado respuestas espectrales asignables a su estructura química. Estos datos aparecen en el procedimiento experimental de esta memoria. La caracterización espectroscópica por  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y FTIR para los compuestos **3**, **32**, **43**, **54**, y **65** se encuentran recogidos en el apartado de Anexos.

#### 5.2.3.1. - Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Protón ( $^1\text{H}$ -RMN)

Al igual que ocurre para los intermedios **4-14**, la señal de  $\delta$  para el grupo metino en los intermedios **26-36** aparece a campo bajo por la sustitución que presenta. Por lo que en estas moléculas va a producirse también efecto inductivo y anisotrópico, justificando así los  $\delta$  que se obtienen para esa señal. Además ocurre la desaparición de la señal correspondiente al H3 del anillo piridínico con la consiguiente reducción de la multiplicidad y acoplamiento con el resto de señales piridínicas. Estos valores aparecen reflejados en la **tabla 9**.

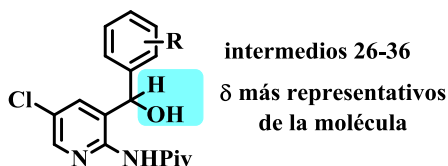
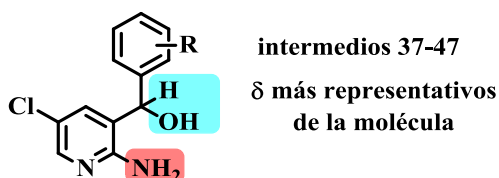


Figura 40. - Estructura química para los intermedios 26-36, y señal más destacable en  $^1\text{H}$ -RMN.

Tabla 9. -  $\delta$  para la señal CH de los intermedios 26-36 en  $^1\text{H}$ -RMN

	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
$\delta$ CH											
$\delta$ (ppm)	6,11	5,90	5,80	5,75	5,90	5,78	5,80	5,95	5,95	5,80	4,75

Para el caso de los intermedios **37-47**, la señal más característica es la pérdida del grupo protector pivaloilo (Piv) y la aparición de un singlete ancho (bs) correspondiente al grupo  $\text{NH}_2$ , estos compuestos seguirán teniendo la señal correspondiente al grupo metino, por lo que su  $\delta$  se puede justificar de la misma forma que para el caso de los intermedios **26-36**.

Figura 41. - Estructura química para los intermedios 37-47, y señal más destacable en  $^1\text{H}$ -RMN.Tabla 10. -  $\delta$  para la señal CH de los intermedios 37-47 en  $^1\text{H}$ -RMN

	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
$\delta$ CH											
$\delta$ (ppm)	6,10	5,90	5,80	5,60	5,90	5,78	5,80	5,95	5,95	5,98	4,75

Para el caso de las señales espectrales pertenecientes a los intermedios **48-58**, la señal más característica va a ser, aparte del grupo CH, la señal espectral correspondiente al  $\text{CH}_2$ . Esta señal, al igual que ocurre en los compuestos **15-25**, no presenta multiplicidad de singlete, sino que adquiere un sistema de espines de no primer orden (AB), es decir no, son químicamente equivalentes. Esto se traduce en una distorsión de intensidades que se manifiesta con el incremento de las líneas internas y el decremento de las líneas externas, fenómeno denominado efecto tejado.

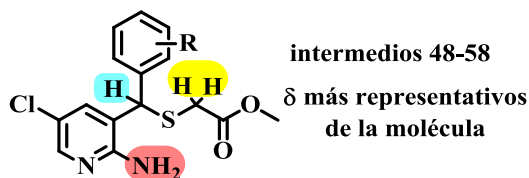


Figura 42. - Estructura química para los intermedios 48-58, y señal más destacable en  $^1\text{H}$ -RMN.

Tabla 11. -  $\delta$  para la señal CH y  $\text{CH}_2$  de los intermedios 48-58 en  $^1\text{H}$ -RMN

	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
$\delta$ CH											
$\delta$ (ppm)	5,58	5,65	5,45	5,12	5,70	5,20	5,15	5,95	5,60	5,60	6,75
$\delta$ $\text{CH}_2$											
$\delta$ (ppm)	3,15	3,15	3,15	3,15	3,20	3,23	3,10	3,10	3,10	3,10	3,25

Los compuestos **59-69**, al igual que sus homólogos bencénicos, tienen como señales espectrales más características el grupo CH y  $\text{CH}_2$  del sistema tiazepina, y igualmente los  $^1\text{H}$  son diasterotópicos<sup>[143]</sup> (tabla 12);

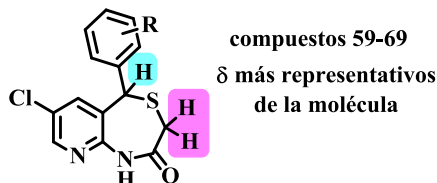


Figura 43. - Estructura química para los compuestos 59-69, y señales más destacables en  $^1\text{H}$ -RMN.

Tabla 12. -  $\delta$  para la señal CH y  $\text{CH}_2$  de los compuestos 59-69 en  $^1\text{H}$ -RMN

	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
$\delta$ CH											
$\delta$	6,11	6,05	5,83	5,62	5,98	5,60	5,60	5,95	5,95	6,00	6,49
$\delta$ $\text{CH}_2$											
$\delta$	3,42/ 3,11	3,35/ 3,10	3,49/ 3,12	3,40/ 3,10	3,30/ 3,12	3,39/ 3,12	3,39/ 3,12	3,39/ 3,12	3,25/ 3,00	3,40/ 3,10	3,75/ 3,50

### 5.2.3.2. - Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN)

Se observan dos señales a campo alto, indicativas de señales de carbonos alifáticos, correspondientes a  $-\text{C}(3)\text{H}_2-$  y  $-\text{C}(5)\text{H}-$ . Las señales aparecidas a campo bajo, alrededor de 135 ppm y 124 ppm, pertenecen a los carbonos del anillo de benceno y piridina. La señal que aparece en torno a 170 ppm pertenece al carbono del grupo carbonilo.

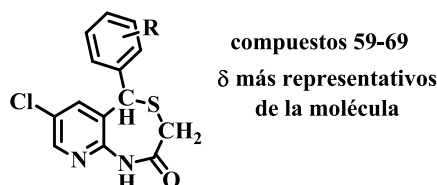


Figura 44. - Estructura química para los compuestos 59-69, y señales más destacables en  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Tabla 13. -  $\delta$  para la señal  $-\text{C}(3)\text{H}_2-$  y  $-\text{C}(5)\text{H}-$  de los compuestos 59-69 en  $^{13}\text{C}$ -RMN

	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
$\delta \text{ C}(3)\text{H}_2$											
$\delta \text{ (ppm)}$	30,9	32,0	31,6	32,0	31,7	30,9	31,1	32,0	31,8	31,7	30,9
$\delta \text{ C}(5)\text{H}$											
$\delta \text{ (ppm)}$	45,7	39,0	42,9	46,3	40,6	45,7	45,1	42,4	43,5	46,0	45,7

### 5.2.3.3. - Espectroscopía de Infrarrojos (FTIR)

El registro de FTIR se ha realizado en un Espectrómetro FT-IR Bruker IFS60v. En el registros de FTIR obtenido para el compuesto **65** se muestran las señales características de una piridotiazepina, siendo las más importantes la banda de vibración ( $\nu_{\text{NH}}(st)$ ), indicativa de un grupo NHCO aproximadamente a  $3400 \text{ cm}^{-1}$ , las bandas de vibración de los CH aromáticos de los anillos de piridina, ( $\nu_{\text{CHaromáticos}}(st)$ ), la banda de vibración de carbonilo ( $\nu_{\text{CO}}(st)$ ) indicativa de la presencia de un grupo CO en la molécula, alrededor de  $1740 \text{ cm}^{-1}$  y la banda de flexión del grupo NHCO, ( $\delta_{\text{NH}}(st)$ ) en torno a  $1500 \text{ cm}^{-1}$ .



#### 5.2.3.4. - Espectrometría de Masas con la técnica de Electrospray (APIES<sup>+</sup>)

Los compuestos **59-69** fueron analizados mediante la técnica de ionización por electrospray análogamente a los anteriores. En todos los espectros se detecta el pico esperado a  $m/z$ , correspondiente a un ion de tipo  $[M+H]^+$ , el cual es el pico de la molécula sin fragmentación ionizada, típico de la técnica de electrospray. También se detectan los aductos  $[M+Na]^+$ ,  $[2M+H]^+$  y  $[2M+Na]^+$ . Además, la distribución isotópica del ión  $[M+H]^+$  nos va a reflejar la presencia de átomos halógenos en la estructura del compuesto.

### 5.3. - Evaluación del perfil neuroprotector de los derivados de CGP37157

#### 5.3.1. - Evaluación del perfil neuroprotector frente a veratridina

Para analizar la capacidad neuroprotectora de los nuevos compuestos frente a un estímulo que provoca una sobrecarga de  $[Ca^{2+}]_{cit}$ , se utilizaron CCB sometidas al estímulo tóxico generado por VTD, fármaco que provoca un mayor tiempo de apertura de los canales de  $Na^+$  con la consiguiente despolarización que induce la apertura de los CCVD<sup>[145]</sup>, generando un patrón de despolarización característico que presenta un tren de continuos incrementos en la concentración de  $[Ca^{2+}]_{cit}$  que daña la célula<sup>[134]</sup>, siendo la función

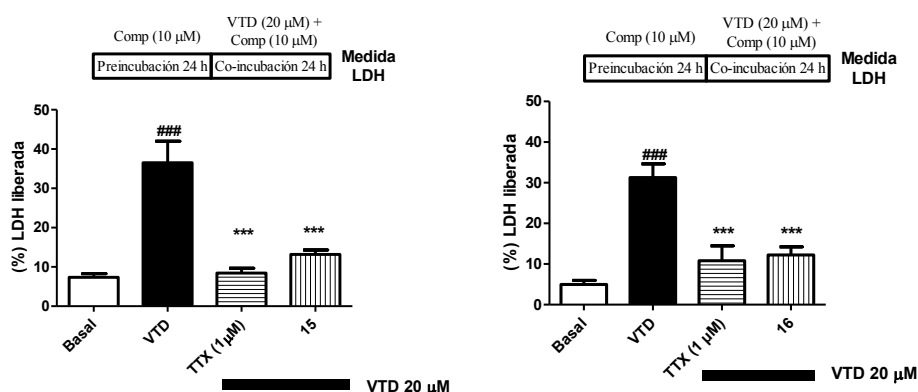
---

<sup>145</sup> Kilpatrick, D.L.; Slepetis, R.J.; Corcoran, J.J.; Kirshner, N. (1982) Calcium uptake and catecholamine secretion by cultured bovine adrenal medulla cells. *J. Neurochem.* **38**:427-435.

mitocondrial una de las dianas más sensibles<sup>[146]</sup>. Nuestro grupo de investigación ha descrito que **CGP37157** es capaz de proteger a las CCB frente al estímulo tóxico generado por VTD por prevenir la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , por bloquear los CCVD, prevenir la sobreproducción de ROS, la despolarización de la membrana mitocondrial y prevenir la liberación de Cit.C<sup>[147]</sup>. Así, se decidió evaluar las dos familias de derivados en este modelo experimental.

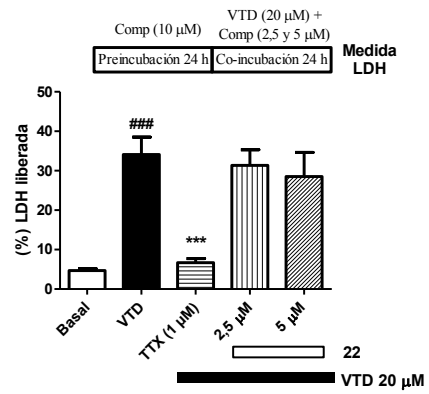
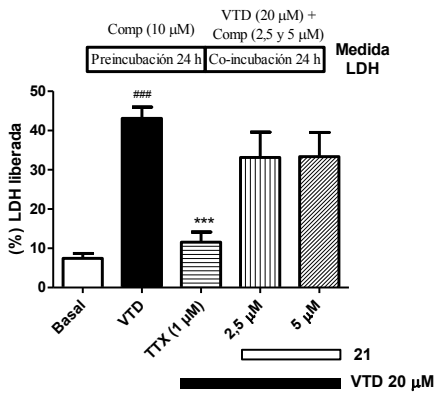
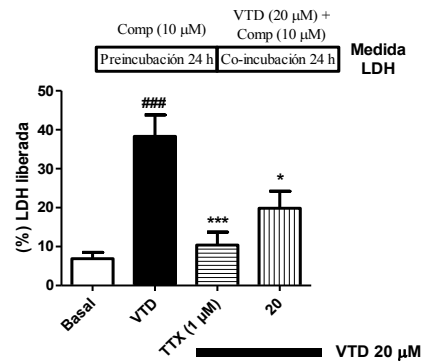
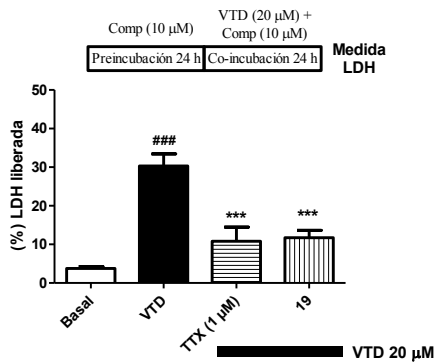
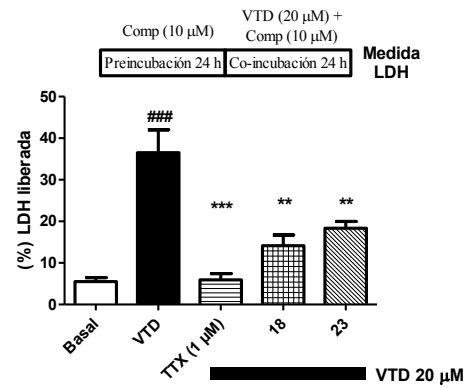
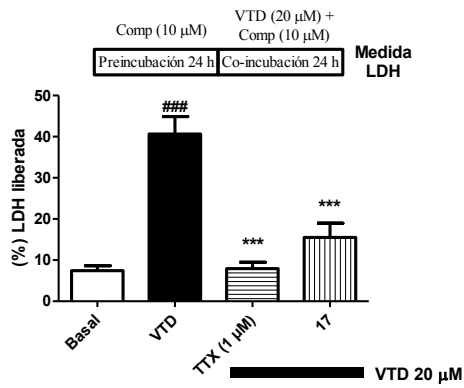
### 5.3.1.1. - Evaluación de los derivados **bencénicos** (15-25)

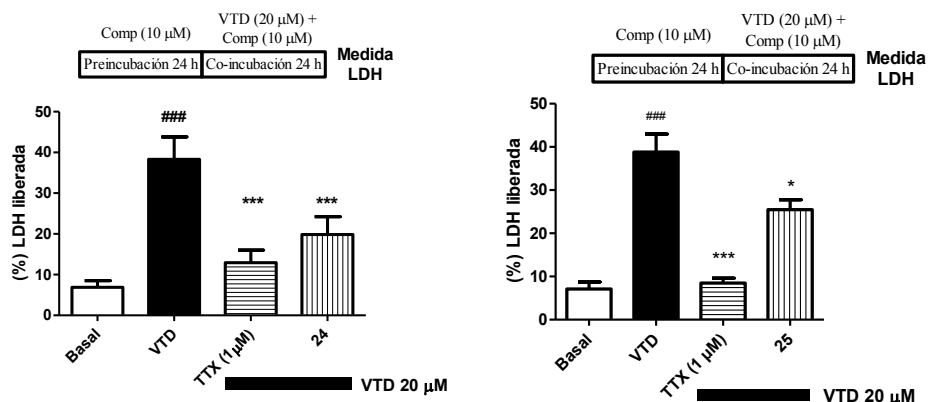
Los experimentos realizados con los 11 derivados **bencénicos** de **CGP37157**, compuestos **15-25**, han mostrado los resultados reflejados en la **figura 45**.



<sup>146</sup> Jordán, J.; Galindo, M.F.; Calvo, S.; González-García, C.; Ceña, V. (2000) Veratridine induces apoptotic death in bovine chromaffin cells through superoxide production. *Br. J. Pharmacol.* **130**:1496-1504.

<sup>147</sup> Nicolau, S.M.; de Diego, A.M.G.; Cortés, L.; Egea, J.; González, J.C.; Mosquera, M.; López, M.G.; Hernández-Guijo, J.M.; García, A.G. (2009) Mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchanger blocker CGP37157 protects against chromaffin cell death elicited by veratridine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**:844-872.





**Figura 45. - Ensayo de muerte celular en células CCB sometidas al agente citotóxico VTD (20  $\mu$ M).** El grupo basal se consideró como la liberación de LDH en estado normal y representa la muerte celular del cultivo en presencia solo del medio de cultivo. Como control positivo se usó TTX (1  $\mu$ M) que ofrece una protección del 90%. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de cuatro experimentos en triplicado; cada experimento se realizó en diferentes pases de células; ###p<0,05, con respecto a solamente a Basal, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, con respecto a VTD.

En cada gráfica de la **figura 45** se muestra el protocolo empleado para monitorizar el efecto protector de los derivados bencénicos de **CGP37157**. Los datos de citoprotección referidos a cada derivado respecto a VTD se encuentran recogidos en la **tabla 14**. Se usó como compuesto de referencia TTX, que redujo la muerte celular, de media, en un  $88\% \pm 10$ . **CGP37157** ejerció una protección de  $76\% \pm 13$ . La concentración elegida para hacer este protocolo de cribado fue 10  $\mu$ M debido a que es la concentración descrita en la que **CGP37157** mostró su mejor actividad citoprotectora<sup>[147]</sup>. No obstante, los compuestos **21** y **22** precipitaron a 10  $\mu$ M, por lo que se decidió analizar estos compuestos a 2,5 y 5  $\mu$ M.

Tabla 14. - Datos de protección (%) derivados bencénicos de CGP37157 frente a VTD

	15	16	17	18	19	20	21
R	2'-CH <sub>3</sub>	2'-Br	2'-Cl	2'-CF <sub>3</sub>	2',6'-diCl	2'-OCH <sub>3</sub>	4'-OCH <sub>3</sub>
[Conc]	10 μM					2,5 μM	5 μM
Prot. (%)	25 ± 4 <sup>ns</sup>	67 ± 9 <sup>***</sup>	76 ± 13 <sup>***</sup>	73 ± 7 <sup>***</sup>	70 ± 7 <sup>***</sup>	53 ± 18 <sup>*</sup>	27 ± 20
	22	23	24	25			
R	2'-H	2'-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4'-F	2'-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>			
[Conc]	2,5 μM	5 μM	10 μM				
Prot. (%)	9 ± 16	21 ± 10 <sup>ns</sup>	59 ± 5 <sup>**</sup>	44 ± 7 <sup>**</sup>	42 ± 8 <sup>*</sup>		

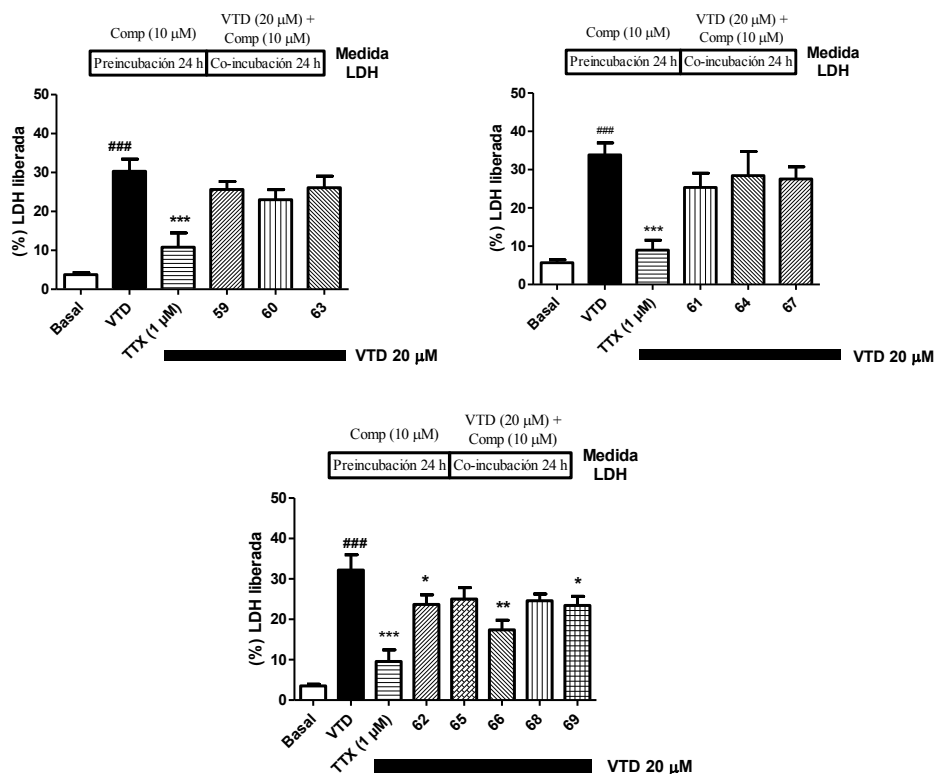
(\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, y ns = no significativo)

De los datos de protección se aprecia que **16**, **18** y **19** presentan un perfil protector similar a **CGP37157**. La introducción de grupos voluminosos electroatrayentes, **16** y **18**, no reduce drásticamente la protección como en el caso de los sustituyentes voluminosos alquílicos, **15** y **23**, o el no presentar sustitución, **22**. La longitud del sustituyente en la posición 2, **20** y **25**, parece reducir el efecto a la que se aumenta la cadena alquílica. Un cambio a la posición 4, parece no revertir mucho el efecto respecto al cabeza de serie, siempre que el sustituyente sea pequeño y electroatrayente, **24**, que si es voluminoso, **21**. Y por último, una doble halogenación, **19**, no reduce la protección que ejerce el compuesto frente al estímulo tóxico.

Se sabe que **CGP37157** es un compuesto multidiana, dado que actúa en canales de Na<sup>+</sup>, CCVD y en mNCX<sup>[147]</sup> de CCB. Por tanto, la protección que ejercen frente al estímulo de VTD viene determinada por la acción sobre todas estas dianas. El hecho de que los compuestos probados no mejoren la capacidad protectora de **CGP37157** puede indicarnos que dichos compuestos no estén actuando en todas las posibles dianas, y sean más selectivas hacia alguna de ellas.

5.3.1.2. - Evaluación de los derivados *piridínicos* (59-69)

Los experimentos realizados con los 11 derivados **piridínicos** de **CGP37157**, compuestos **59-69**, mostraron los siguientes resultados (**figura 46**)



**Figura 46. - Ensayo de muerte celular en células CCB sometidas al agente citotóxico VTD (20 μM).** El grupo basal se consideró como la liberación de LDH en estado normal y representa la muerte celular del cultivo en presencia solo del medio de cultivo. Como control positivo se usó TTX (1 μM) que ofrece una protección del 90%. Los datos son medias ± S.E.M. de cuatro experimentos en triplicado; cada experimento se realizó en diferentes pases de células; ###p<0,05, con respecto a solamente a Basal, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, con respecto a VTD.

En la **tabla 15** se muestran los datos como porcentaje de protección frente a VTD (20 μM). Se usó como compuesto de referencia TTX, que redujo la pérdida de muerte celular, de media, en un 99% ± 4. **CGP37157** ejerció una protección de 76% ± 13.

Tabla 15. - Datos de protección (%) derivados piridínicos de CGP37157 frente a VTD

	59	60	61	62	63	64	65
R	2'-CF <sub>3</sub>	2'-OCH <sub>3</sub>	2'-CH <sub>3</sub>	4'-OCH <sub>3</sub>	2'-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2'-H	4'-F
[Conc]	10 μM						
Prot. (%)	17 ± 8 <sup>ns</sup>	27 ± 8 <sup>*</sup>	14 ± 7 <sup>ns</sup>	27 ± 8 <sup>*</sup>	17 ± 9 <sup>ns</sup>	23 ± 20 <sup>ns</sup>	22 ± 9 <sup>ns</sup>
	66		67		68		69
R	2'-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		2'-Cl		2'-Br		2',6'-diCl
[Conc]	10 μM						
Prot. (%)	49 ± 8 <sup>**</sup>		22 ± 9 <sup>ns</sup>		23 ± 4 <sup>ns</sup>		27 ± 7 <sup>*</sup>

(\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, y ns = no significativo)

En esta familia de derivados, la protección frente a VTD se reduce drásticamente respecto a **CGP37157**. Se produce un aumento de la protección a medida que vamos aumentando el volumen del sustituyente en la posición 2, el compuesto **66** es el que mayor porcentaje de protección presenta de todos los derivados. La longitud de la cadena y el cambio de la posición sustituida disminuye la protección frente a VTD. El hecho de hacer más solubles los compuestos por introducción de un anillo de piridina, se reduzca la protección frente a VTD nos puede indicar que los compuestos se están haciendo más selectivos frente a algunas dianas, debido a que ya no se produce la misma respuesta protectora que tiene **CGP37157**.

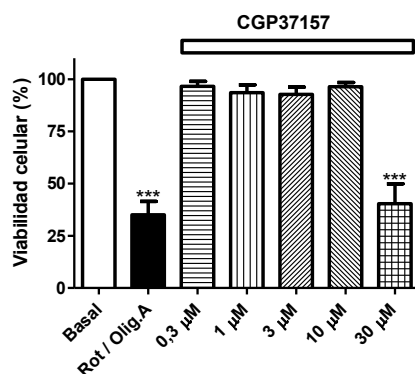
### 5.3.2. - Evaluación del perfil neuroprotector frente a 70 mM de K<sup>+</sup>

Se sabe que **CGP37157** bloquea los canales de Ca<sup>2+</sup> en presencia de alto K<sup>+</sup>, evitando de esta forma una alteración de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cit</sub><sup>[148]</sup>. Se decidió realizar un cribado de los compuestos en células SH-SY5Y expuestas al estímulo tóxico de alto K<sup>+</sup>. Este efecto puede ser parcialmente relacionado con el bloqueo directo de CCVD<sup>[113]</sup>. La alteración del flujo de Ca<sup>2+</sup> a través de CCVD tipo L

<sup>148</sup> González-Lafuente, L.; Egea, J.; León, R.; Martínez-Sanz, F.J.; Monjas, L.; Perez, C.; Merino, C.; García-De Diego, A.M.; Rodríguez-Franco, M.I.; García, A.G.; Villarroya, M.; López, M.G.; De Los Ríos, C. (2012) Benzothiazepine CGP37157 and its isosteric 2'-methyl analogue provide neuroprotection and block cell calcium entry. *ACS. Chem. Neurosci.* **3**:519-529.

(Ca<sub>v</sub>1.1-1.4) es un mecanismo clave de muerte neuronal que ocurre en varios eventos fisiopatológicos<sup>[149]</sup>, tales como los procesos neurodegenerativos.

Primero se quiso evaluar la posible toxicidad "*per-se*" de **CGP37157** en células SH-SY5Y, aplicando dicho compuesto a diferentes concentraciones (0,3  $\mu$ M hasta 30  $\mu$ M) usando como control de muerte celular el coctel tóxico Rotenona 30  $\mu$ M / Oligomicina A 10  $\mu$ M. (Rot/Olig. A). La viabilidad de los grupos se determinó por el método de reducción de MTT.



**Figura 47. - Ensayo de reducción de MTT en células SH-SY5Y sometidas a CGP37157 y como control de muerte el estímulo tóxico Rot/Olig. A.** El grupo basal se consideró como la máxima viabilidad (100%), y representa la viabilidad del cultivo en presencia solo del medio de cultivo. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de cuatro experimentos en triplicado; cada experimento se realizó en diferentes pases de células; \*\*\* $p < 0,001$ , con respecto solamente a Basal.

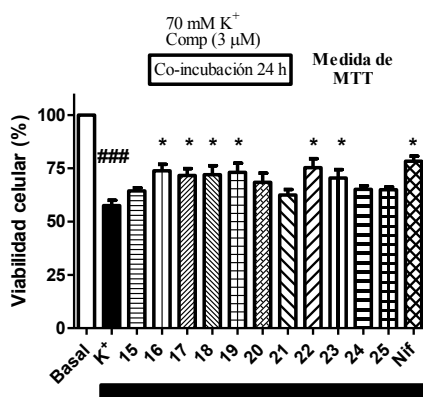
Las concentraciones de **CGP37157** en el rango 0,3 - 10  $\mu$ M no disminuyeron la viabilidad celular con respecto a la basal durante las 24 h de incubación. Sin embargo, a 30  $\mu$ M **CGP37157**, por sí mismo, muestra un marcado efecto tóxico (alrededor del 50% de reducción de viabilidad) (**figura 47**). En consecuencia, sabemos que a partir de esa última concentración **CGP37157** resultó ser citotóxico.

<sup>149</sup> Cano-Abad, M.F.; Villarroya, M.; García, A.G.; Gabilan, N.H.; López, M.G. (2001) Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J. Biol. Chem.* **276**:39695-39704.



### 5.3.2.1. - Evaluación de los derivados *bencénicos* (15-25)

Los experimentos realizados con los 11 derivados *bencénicos* de CGP37157, compuestos 15-25, han mostrado los siguientes resultados (**figura 48**)



**Figura 48. - Ensayo de reducción de MTT en células *SH-SY5Y* sometidas a sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  por alto  $\text{K}^+$ .** El grupo basal se consideró como la máxima viabilidad (100%), y representa la viabilidad del cultivo en presencia solo del medio de cultivo. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de cuatro experimentos en triplicado; cada experimento se realizó en

diferentes pases de células; ### $p < 0,05$ , \* $p < 0,05$ , con respecto a solamente a Basal.

En la **figura 48** se muestra el protocolo junto con el efecto de los compuestos frente a la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  por alto  $\text{K}^+$ . Esta familia de compuestos muestra un perfil neuroprotector aparente con respecto al cabeza de serie, 17, **tabla 16**. Se usó como compuesto de referencia nifedipino, que redujo la pérdida de viabilidad, de media en un  $24\% \pm 2$ .

**Tabla 16. - Datos de protección (%) derivados *bencénicos* de CGP37157 frente a alto  $\text{K}^+$**

	15	16	17	18	19	20
R	2'-CH <sub>3</sub>	2'-Br	2'-Cl	2'-CF <sub>3</sub>	2',6'diCl	2'-OCH <sub>3</sub>
Protección (%)	13 $\pm$ 4 <sup>ns</sup>	37 $\pm$ 5 <sup>*</sup>	36 $\pm$ 6 <sup>*</sup>	36 $\pm$ 6 <sup>*</sup>	33 $\pm$ 12 <sup>*</sup>	10 $\pm$ 3 <sup>ns</sup>
	21	22	23	24	25	Nif
R	4'-OCH <sub>3</sub>	2'-H	2'-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4'-F	2'-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
Protección (%)	10 $\pm$ 3 <sup>ns</sup>	43 $\pm$ 10 <sup>*</sup>	36 $\pm$ 6 <sup>*</sup>	14 $\pm$ 4 <sup>ns</sup>	13 $\pm$ 4 <sup>ns</sup>	24 $\pm$ 2 <sup>*</sup>

(\* $p < 0,05$ , y ns = no significativo)

De los datos de protección que se obtienen, se observó que varios derivados presentan un perfil protector similar al control positivo, y también se

apreció como afecta la sustitución a dicha protección. La introducción de grupos voluminosos electroatrayentes, **16**, **17** y **18**, no reduce drásticamente la protección como en el caso de los sustituyentes alquílicos, **15**. Pero compuesto **23** presenta un perfil protector bueno donde el sustituyente alquílico es más voluminoso. El no presentar sustitución, **22** favorece la protección. La longitud del sustituyente en la posición 2, **20** comparado con **25**, parece reducir el efecto de bloqueo. Un cambio a la posición 4, parece no ejercer un efecto de bloqueo significativo **21** y **24**. Y por último, una doble halogenación, **19**, ejerce un efecto de bloqueo de canales significativo.

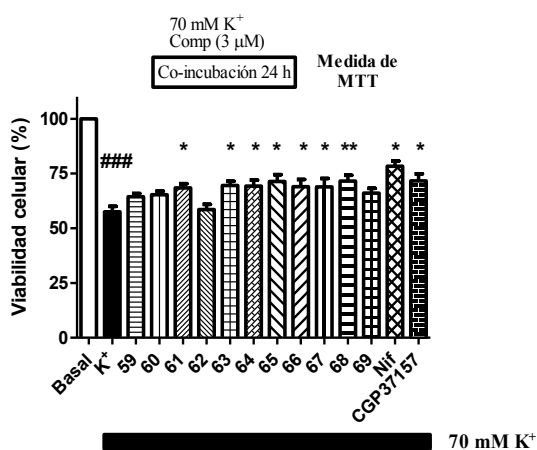
Sabiendo que **CGP37157** inhibe CCVD del tipo L, y que regula directamente la absorción y liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del RE en el músculo estriado<sup>[150]</sup>, podemos afirmar que ciertos derivados de **CGP37157** bloquean eficazmente la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por alto  $\text{K}^{+}$  con una eficacia similar a los inhibidores de CCVD tipo nifedipino. Este efecto puede ser debido a que la despolarización producida por el estímulo induce un aumento de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$  que es capaz de regular **CGP37157** y sus derivados<sup>[151]</sup>.

#### 5.3.2.2. - Evaluación de los derivados *piridínicos* (59-69)

Los experimentos realizados con los 11 derivados **piridínicos** de **CGP37157**, compuestos **59-69**, han mostrado los resultados recogidos en la **figura 49**.

<sup>150</sup> Neumann, J.T.; Diaz-Sylvester, P.L.; Fleischer, S.; Copello, J.A. (2011) CGP37157 inhibits the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and activates ryanodine receptor channels in striated muscle. *Mol. Pharmacol.* **79**:141-147.

<sup>151</sup> Ruiz, A.; Alberdi, E.; Matute, C. (2014) CGP37157, an inhibitor of the mitochondrial  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, protects neurons from excitotoxicity by blocking voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Cell Death. Dis.* **5**:e1156.



\*p<0,05, \*\*p<0,001, con respecto a solamente a Basal.

**Figura 49. - Ensayo de reducción de MTT en células *SH-SY5Y* sometidas a sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> por alto K<sup>+</sup>.** El grupo basal se consideró como la máxima viabilidad (100%), y representa la viabilidad del cultivo en presencia solo del medio de cultivo. Los datos son medias ± S.E.M. de cuatro experimentos en triplicado; cada experimento se realizó en diferentes pases de células; ###p<0,05

En la **figura 49** se muestra el protocolo de ensayo junto con el efecto de los compuestos sobre los efectos de la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> por alto K<sup>+</sup>. Esta familia de compuestos muestra un perfil neuroprotector inferior con respecto al cabeza de serie, **CGP37157**, (**tabla 17**). Se uso como compuesto de referencia nifedipino, que redujo la pérdida de viabilidad, de media en un 24% ± 2.

**Tabla 17. - Datos de protección (%) derivados piridínicos de CGP37157 frente a alto K<sup>+</sup>**

	59	60	61	62	63	64
R	2'-CF <sub>3</sub>	2'-OCH <sub>3</sub>	2'-CH <sub>3</sub>	4'-OCH <sub>3</sub>	2'-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2'-H
Protección (%)	19 ± 4 <sup>ns</sup>	17 ± 3 <sup>ns</sup>	22 ± 3 <sup>*</sup>	10 ± 3 <sup>ns</sup>	28 ± 2 <sup>*</sup>	21 ± 3 <sup>*</sup>
	65	66	67	68	69	Nif
R	4'-F	2'CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2'-Cl	2'-Br	2',6'-diCl	
Protección (%)	27 ± 4 <sup>*</sup>	28 ± 5 <sup>*</sup>	33 ± 3 <sup>*</sup>	30 ± 2 <sup>**</sup>	13 ± 10 <sup>ns</sup>	24 ± 2 <sup>*</sup>

(\*p<0,05, \*\*p<0,001, y ns = no significativo)

De los datos de protección que se obtuvieron, se aprecia vemos que ninguno de los compuestos presenta un perfil protector similar al **CGP37157**, modificándose la magnitud según la sustitución. Es posible que el cambio de benceno por piridina haya hecho perder afinidad por el sitio de unión a benzotiazepinas en los CCVD.

### 5.3.3. - Evaluación en rodajas de hipocampo de rata frente a glutamato

Este modelo de muerte neuronal que induce una alteración del  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por el r-MNDA se posiciona como el más relevante desde el punto de vista patogénico, ya que está estrechamente relacionado con varios trastornos neurodegenerativos y accidentes cerebrovasculares<sup>[152]</sup>. Además, observaciones recientes han confirmado la influencia de las mitocondrias en la regulación de la excitotoxicidad<sup>[153]</sup>. Este mecanismo subyacente depende de (i) la captación de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ <sup>[154]</sup>, que conduce a la disfunción mitocondrial y a la muerte celular<sup>[155]</sup> y (ii) la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ , que puede provocar la necrosis neuronal y apoptosis mediante la activación de las caspasas y calpaínas<sup>[156]</sup>. A su vez, la elevación de  $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$  despolariza la membrana plasmática y abre CCVD que contribuyen a la excitotoxicidad<sup>[157]</sup>.

<sup>152</sup> Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. **1**:623-634.

<sup>153</sup> Abramov, A.Y.; Duchen, M.R. (2010) Impaired mitochondrial bioenergetics determines glutamate-induced delayed calcium deregulation in neurons. *Biochim. Biophys. Acta*. **1800**:297-304.

<sup>154</sup> Stout, A.K.; Raphael, H.M.; Kanterewicz, B.I.; Klann, E.; Reynolds, I.J. (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat. Neurosci.* **1**:366-373.

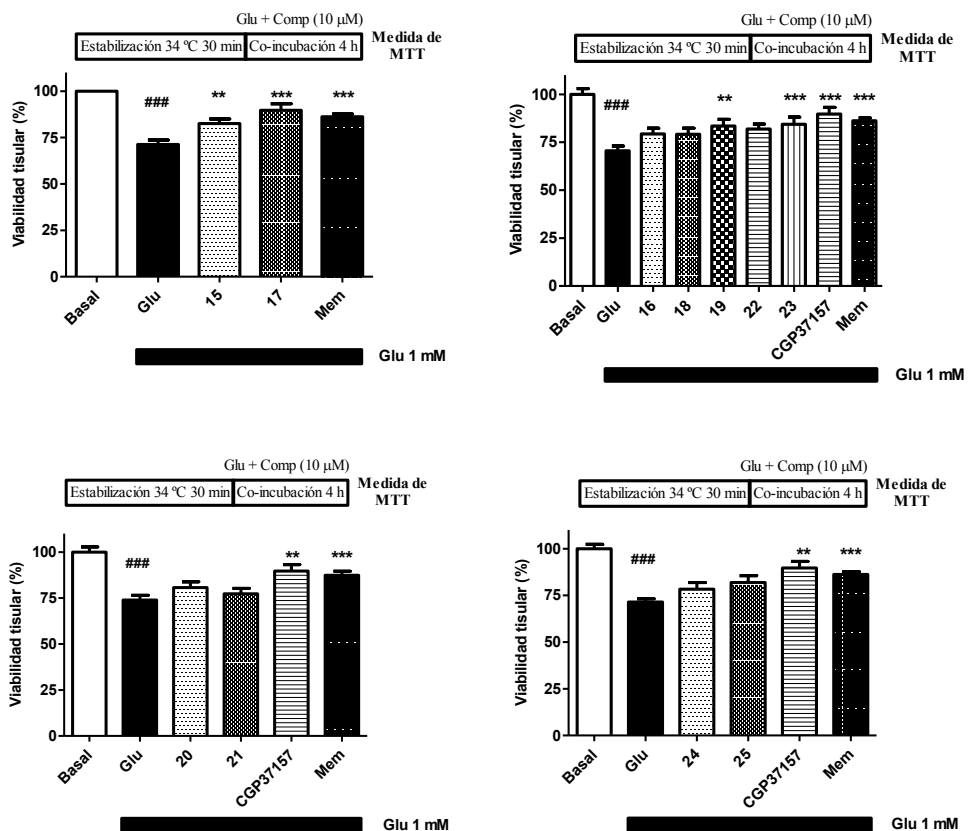
<sup>155</sup> a) Stanika, R.I.; Pivovarova, N.B.; Brantner, C.A.; Watts, C.A.; Winters, C.A.; Andrews, S.B. (2009) Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**:9854-9859. b) Starkov, A.A.; Chinopoulos, C.; Fiskum, G. (2004) Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium*. **36**:257-264.

<sup>156</sup> Wang, K.K. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* **23**:20-26.

<sup>157</sup> a) Brewer, L.D.; Thibault, O.; Staton, J.; Thibault, V.; Rogers, J.T.; García-Ramos, G. (2007) Increased vulnerability of hippocampal neurons with age in culture: temporal association with increases in NMDA receptor current, NR2A subunit expression and recruitment of L-type calcium channels. *Brain. Res.* **1151**:20-31. b) Prehn, J.H.; Lippert, K.; Kriegstein, J. (1995) Are NMDA or AMPA/kainate receptor antagonists more efficacious in the delayed treatment of excitotoxic neuronal injury? *Eur. J. Pharmacol.* **292**:179-189.

### 5.3.3.1. - Evaluación de los derivados **bencénicos** (15-25)

Los experimentos realizados con los 11 derivados **bencénicos** de **CGP37157**, compuestos **15-25**, han mostrado los siguientes resultados en este modelo experimental (**figura 50**)



**Figura 50. - Ensayo de reducción de MTT en rodajas de hipocampo frente a los efectos neurotóxicos de glutamato 1 mM (Glu).** La memantina (Mem) se utilizó como compuesto de referencia a 10  $\mu$ M, al igual que el cabeza de serie **CGP37157** (10  $\mu$ M). El grupo basal se consideró como la máxima viabilidad (100%), y representa la viabilidad de las rodajas en presencia solo del medio de cultivo. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ , con respecto a Glu ### $p<0,05$ , con respecto a Basal.

En la **figura 50** se muestra el protocolo junto con el efecto de los compuestos sobre los efectos neurotóxicos del Glu. Esta familia de compuestos ensayados muestra un perfil neuroprotector aparente con respecto al cabeza de serie, **17**, **tabla 18**. Se uso como compuesto de referencia memantina, que redujo la perdida de viabilidad, de media en un  $43\% \pm 5$ .

**Tabla 18. - Datos de protección (%) derivados bencénicos de CGP37157 frente a Glu**

	15	16	17	18	19	20
R	2'-CH <sub>3</sub>	2'-Br	2'-Cl	2'-CF <sub>3</sub>	2',6'diCl	2'-OCH <sub>3</sub>
Protección (%)	45 ± 7**	15 ± 6 <sup>ns</sup>	37 ± 9***	13 ± 10 <sup>ns</sup>	43 ± 11**	15 ± 6 <sup>ns</sup>
	21	22	23	24	25	Mem
R	4'-OCH <sub>3</sub>	2'-H	2'-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4'-F	2'-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
Protección (%)	13 ± 8 <sup>ns</sup>	33 ± 10*	48 ± 6***	26 ± 8*	20 ± 14 <sup>ns</sup>	43 ± 5***

(\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, y ns = no significativo)

Analizando los datos, se puede ver que el cabeza de serie, **17**, presenta una buena protección frente a este modelo experimental, y que la introducción de sustituyentes voluminosos con efecto electroatrayentes, **16** y **18**, disminuyen esa protección, al contrario que para el caso de sustituyentes voluminosos alquílicos, **15** y **23** o el no presentar sustitución, **22**. Un aumento en la longitud de la cadena, **20** y **25**, no mejoran dicha protección respecto a **17**. Se aprecia también, que un cambio de la posición de la sustitución, de posición orto a para, disminuye la protección, **24** y **21**. El aumento de la halogenación, **19**, aumenta la capacidad de protección del compuesto en este modelo experimental.

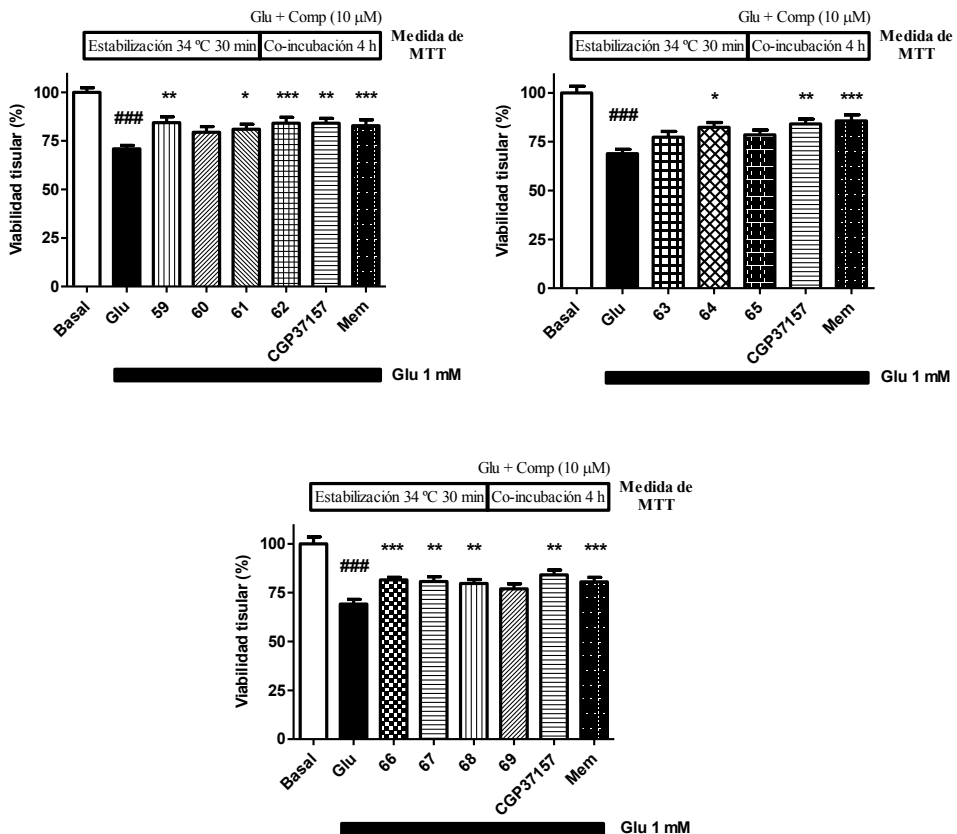
**CGP37157** es capaz de regular los transientes citosólicos de Ca<sup>2+</sup> inducidos por Glu por la inhibición selectiva del mNCX en las neuronas<sup>[112]</sup>. También, de acuerdo con observaciones anteriores en rodajas de hipocampo sometidos a una sobrecarga Na<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup><sup>[150,158]</sup>, encontramos que **CGP37157** y

<sup>158</sup> Nicolau, S.M.; Egea, J.; López, M.G.; García, A.G. (2010) Mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, a new target for neuroprotection in rat hippocampal slices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**:140-144.

sus derivados reducen significativamente la excitotoxicidad producida por aumento de la  $[Ca^{2+}]_{cit}$ , como se espera de una inhibición del mNCK. Estos datos sugieren que tanto **CGP37157** como sus derivados atenúa la sobrecarga citosólica y mitocondrial de  $Ca^{2+}$ , como consecuencia de la modulación negativa de r-NMDA y CCVD.

### 5.3.3.2. - Evaluación de los derivados *piridínicos* (59-69)

Los experimentos realizados con los 11 **piridoderivados** de **CGP37157**, compuestos **59-69**, han mostrado los siguientes resultados en este modelo experimental (**figura 51**)



**Figura 51. - Ensayo de reducción de MTT en rodajas de hipocampo frente a los efectos neurotóxicos de glutamato (Glu 1 mM).** La memantina (Mem) se utilizó como compuesto de referencia a 10 μM al igual que el cabeza de serie **CGP37157** (10 μM). El grupo basal se

consideró como la máxima viabilidad (100%), y representa la viabilidad de las rodajas en presencia solo del medio de cultivo. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , con respecto a Glu ### $p < 0,05$ , con respecto a Basal.

En la **figura 51** se muestra el protocolo junto con el efecto de los compuestos sobre los efectos neurotóxicos del Glu. Esta familia de compuestos ensayados muestra un perfil neuroprotector aparente con respecto al cabeza de serie, **CGP37157**, **tabla 19**. Se usó como compuesto de referencia memantina, que redujo la pérdida de viabilidad, de media en un  $43\% \pm 5$  y **CGP37157** que redujo la viabilidad en un  $33\% \pm 9$ .

**Tabla 19. - Datos de protección (%) derivados piridínicos de CGP37157 frente a Glu**

	59	60	61	62	63	64
R	2'-CF <sub>3</sub>	2'-OCH <sub>3</sub>	2'-CH <sub>3</sub>	4'-OCH <sub>3</sub>	2'-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2'-H
Protección (%)	42 $\pm$ 10**	13 $\pm$ 8 <sup>ns</sup>	27 $\pm$ 14*	34 $\pm$ 7***	11 $\pm$ 8 <sup>ns</sup>	33 $\pm$ 5*
	65	66	67	68	69	Mem
R	4'-F	2'CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2'-Cl	2'-Br	2',6'-diCl	
Protección (%)	20 $\pm$ 8 <sup>ns</sup>	33 $\pm$ 4***	27 $\pm$ 10**	28 $\pm$ 6**	18 $\pm$ 8 <sup>ns</sup>	43 $\pm$ 5***

(\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , y ns = no significativo)

Analizando los datos, se puede ver que excepto 3 compuestos, **60**, **63**, y **65**, los demás presentan una protección significativa respecto a este modelo de sobrecarga de Ca<sup>2+</sup>. **CGP37157**, en estas condiciones, presentó diferente protección que para los compuestos anteriores esto puede ser debido a problemas de solubilidad y accesibilidad a las rodajas, aun así presenta una protección significativa. Por lo comentado anteriormente se puede justificar la protección que ejercen estos compuestos en este modelo de sobrecarga de Ca<sup>2+</sup>.



#### 5.3.4. - Evaluación del perfil neuroprotector frente a estrés oxidativo

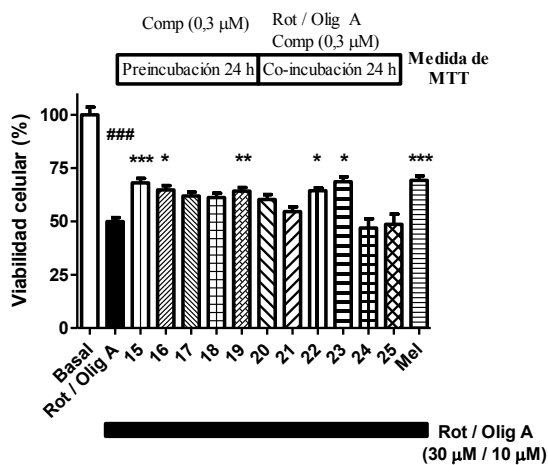
Al analizar la capacidad neuroprotectora de los nuevos compuestos frente a estrés oxidativo, se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, a la que se administró el cóctel tóxico Rot/Olig. A, el cual bloquea el complejo I y V, respectivamente, de la CTE mitocondrial. De esta manera, se interrumpe la síntesis de ATP, lo que deriva en la generación de gran cantidad de radicales libres y ROS. Además, la entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria hace que se abra el mPTP, llevando a un colapso en el potencial electroquímico  $\text{H}^+$ , lo que provoca una disminución en los niveles de ATP y un aumento de ROS. La disminución en la producción de ATP conlleva una despolarización de la membrana plasmática y la entrada de más  $\text{Ca}^{2+}$  creando un círculo vicioso que lleva a la pérdida de la función neuronal y muerte de la célula<sup>[159]</sup>. Este modelo experimental permite evaluar la capacidad de los compuestos frente al evento fisiológico del estrés oxidativo y obtener información de qué compuestos presentan un perfil neuroprotector optimo para dicho evento. Además, el bloqueo del complejo I mitocondrial por medio de la rotenona es considerado como un modelo de hipoxia muy reproducible in vitro que reproduce los acontecimientos fisiopatológicos relacionados con la isquemia cerebral<sup>[160]</sup>.

##### 5.3.4.1. - Evaluación de los derivados **bencénicos** (15-25)

Los experimentos realizados con los 11 derivados **bencénicos** de **CGP37157**, compuestos **15-25**, evaluados a 0,3  $\mu\text{M}$ , han mostrado propiedades neuroprotectoras (**figura 52**).

<sup>159</sup> Olanow, C.A. (1993) A Radical Hypothesis for neurodegeneration. *TINS*. **16**:439-444

<sup>160</sup> Galkin, A.; Abramov, A.Y.; Frakich, N.; Duchon, M.R.; Moncada, S. (2009) Lack of oxygen deactivates mitochondrial complex I: implications for ischemic injury? *J. Biol. Chem.* **284**:36055-36061.



**Figura 52. - Ensayo de reducción de MTT en células *SH-SY5Y* sometidas al estímulo tóxico Rot/Olig A en presencia de derivados bencénicos de CGP37157.** La melatonina (Mel) se utilizó como compuesto de referencia a 30 nM. El grupo basal se consideró como la máxima viabilidad (100%), y representa la viabilidad del cultivo en presencia solo del medio de cultivo. Los datos

son medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; cada experimento se realizó en diferentes pases de células; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , con respecto a Rot/Olig. A. ### $p < 0,01$ , con respecto a Basal.

En la **figura 52** se muestra el protocolo junto con el efecto de los compuestos sobre la lesión producida por Rot/Olig. A. Esta primera familia de compuestos ensayados muestra un perfil neuroprotector aparente, ya que reducen la pérdida de viabilidad ejercida por la aplicación del coctel tóxico, (**tabla 20**). Se uso como compuesto de referencia la melatonina, que redujo la perdida de viabilidad, en este modelo, en un  $27\% \pm 3$ .

**Tabla 20. - Datos de protección (%) derivados bencénicos de CGP37157 frente a Rot/Olig. A**

	15	16	17	18	19	20
R	2'-CH <sub>3</sub>	2'-Br	2'-Cl	2'-CF <sub>3</sub>	2',6'diCl	2'-OCH <sub>3</sub>
Protección (%)	37 $\pm$ 4 <sup>***</sup>	28 $\pm$ 9 <sup>*</sup>	18 $\pm$ 3 <sup>ns</sup>	24 $\pm$ 8 <sup>ns</sup>	30 $\pm$ 7 <sup>**</sup>	20 $\pm$ 16 <sup>ns</sup>
	21	22	23	24	25	Mel
R	4'-OCH <sub>3</sub>	2'-H	2'-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4'-F	2'-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
Protección (%)	7 $\pm$ 5 <sup>ns</sup>	27 $\pm$ 9 <sup>*</sup>	39 $\pm$ 9 <sup>*</sup>	15 $\pm$ 4 <sup>ns</sup>	22 $\pm$ 6 <sup>ns</sup>	27 $\pm$ 3 <sup>***</sup>

(\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , y ns = no significativo)

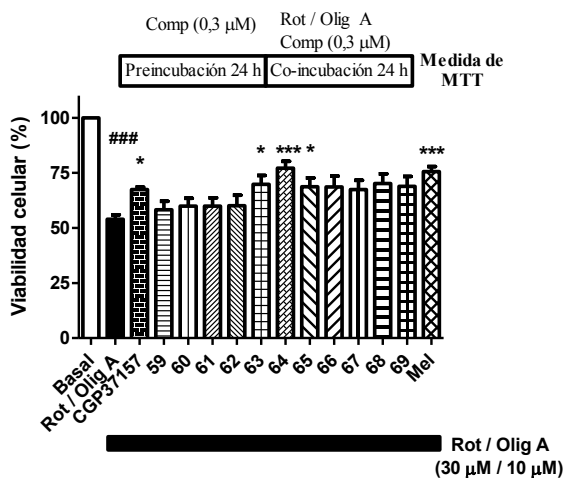
Analizando los datos, se puede ver como el aumento del volumen del sustituyente, **15**, **16** y **23**, mejora la protección en este modelo experimental respecto al cabeza de serie, **17**. Se aprecia también, que un aumento de la

longitud de cadena del sustituyente, **20** frente a **25**, no mejoran la protección, al igual que el cambio de posición del sustituyente, **24** y **21**, es más en algunos caso el compuesto pierde eficacia frente a la protección. El aumento de la halogenación, **19**, aumenta la capacidad de protección del compuesto en este modelo experimental.

Según este modelo de estrés oxidativo generado en la mitocondria, podemos observar como buena parte de los compuestos presentan un buen perfil antioxidante, ya que son capaces de revertir la acción de las ROS y el posible daño neuronal.

#### 5.3.4.2. - Evaluación de los derivados *piridínicos* (59-69)

En cuanto a la familia de **piridoderivados** de **CGP37157** frente al modelo de Rot/Olig. A tenemos los siguientes resultados, (**figura 53**)



**Figura 53. - Ensayo de reducción de MTT en células *SH-SY5Y* sometidas al estímulo tóxico Rot/Olig. A en presencia de derivados piridínicos de CGP37157.** La melatonina (Mel) se utilizó como compuesto de referencia a 30 nM. El grupo basal se consideró como la máxima viabilidad (100%), y representa la viabilidad del cultivo en presencia solo del medio de cultivo. Los datos son

medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; cada experimento se realizó en diferentes pases de células; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  con respecto a Rot/Olig. A. ### $p < 0,05$ , con respecto a Basal.

En la **figura 53** se muestra el protocolo de ensayo junto con el efecto de los compuestos sobre la lesión producida por Rot/Olig. A. Esta familia de compuestos ensayados muestra un perfil neuroprotector ya que reducen la pérdida de viabilidad ejercida por la aplicación del coctel tóxico, **tabla 21**, Se uso como compuesto de referencia la melatonina, que redujo la perdida de viabilidad, en este modelo, en un  $27\% \pm 3$  y **CGP37157**, como cabeza de serie, que redujo la viabilidad en un  $21\% \pm 7$ .

**Tabla 21. - Datos de protección (%) derivados piridínicos de CGP37157 frente a Rot/Olig. A**

	59	60	61	62	63	64
R	2'-CF <sub>3</sub>	2'-OCH <sub>3</sub>	2'-CH <sub>3</sub>	4'-OCH <sub>3</sub>	2'-OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2'-H
Protección (%)	18 ± 2 <sup>ns</sup>	19 ± 3 <sup>ns</sup>	21 ± 4 <sup>ns</sup>	23 ± 8 <sup>ns</sup>	26 ± 6 <sup>*</sup>	30 ± 5 <sup>***</sup>
	65	66	67	68	69	Mel
R	4'-F	2'CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2'-Cl	2'-Br	2',6'-diCl	
Protección (%)	24 ± 5 <sup>*</sup>	19 ± 8 <sup>ns</sup>	11 ± 2 <sup>ns</sup>	21 ± 5 <sup>ns</sup>	11 ± 2 <sup>ns</sup>	27 ± 3 <sup>***</sup>

(\*p<0,05, \*\*\*p<0,001, y ns = no significativo)

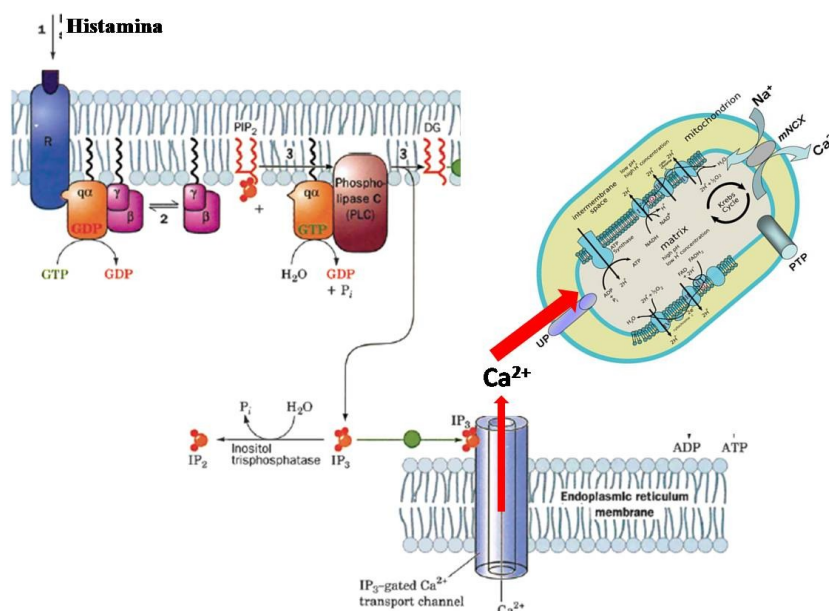
Analizando los datos, se aprecia que la ausencia de sustituyentes, **64**, sustituyentes de cadena larga, **63**, y un cambio a la posición *para* con un sustituyente muy electroatrayente, **65**, presentan un perfil antioxidante en este modelo experimental.

#### 5.4. - Evaluación de los derivados de CGP37157 como bloqueantes del mNCX

##### 5.4.1. - Evaluación de los compuestos en células HeLa intactas

Para poder conocer el posible efecto de los compuestos sobre el mNCX se utilizaron experimentos en células HeLa expuestas a histamina. La histamina se une a su receptor H<sub>1</sub> en la membrana plasmática el cual, mediante el acoplamiento a proteína G, activa la fosfolipasa C (PLC), generándose IP<sub>3</sub>, que interacciona con el r-IP<sub>3</sub> del RE y produce la salida de Ca<sup>2+</sup> al citosol. Este Ca<sup>2+</sup>

es rápidamente captado por la mitocondria mediante el MCU y liberado de nuevo al citosol por parte del mNCX. De esta forma se puede evaluar el efecto de potenciales compuestos como reguladores de la  $[Ca^{2+}]_{mit}$  por la medición de los parámetros cinéticos del tiempo de aclaramiento<sup>[161]</sup>.



**Figura 54.** - Salida de  $Ca^{2+}$  del RE inducida por Histamina con activación de la cascada de señalización del  $IP_3$ .

Según lo expuesto en el apartado de procedimiento experimental (apartado 4.5.2), una solución extracelular con 100  $\mu$ M de histamina induce la salida de  $Ca^{2+}$  del RE. La exposición a los compuestos podrá afectar a la subida de  $[Ca^{2+}]_{mit}$  y a su aclaramiento, por lo que primero se realizó una curva del cabeza de serie, para saber a qué concentración se obtendrían los mejores parámetros para poder evaluar el resto de compuestos. (figura 55).

<sup>161</sup> Hernández-SanMiguel, E.; Vay, L.; Santo-Domingo, J.; Lobatón, C.D.; Moreno, A.; Montero, M.; Alvarez, J. (2006) The mitochondrial  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger plays a key role in the control of cytosolic  $Ca^{2+}$  oscillations. *Cell Calcium*. **40**:53-61.

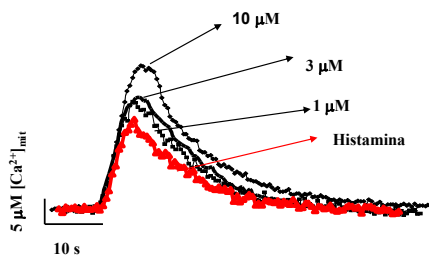


Figura 55. - Perfil del  $[Ca^{2+}]_{mit}$  inducido por histamina y curvas de aclaramiento mitocondrial según concentraciones crecientes de CGP37157.

Los diferentes parámetros analizados para **CGP37157**, se esquematizan en la **figura 56**.

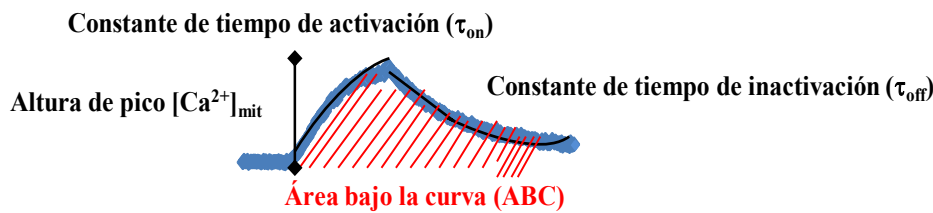
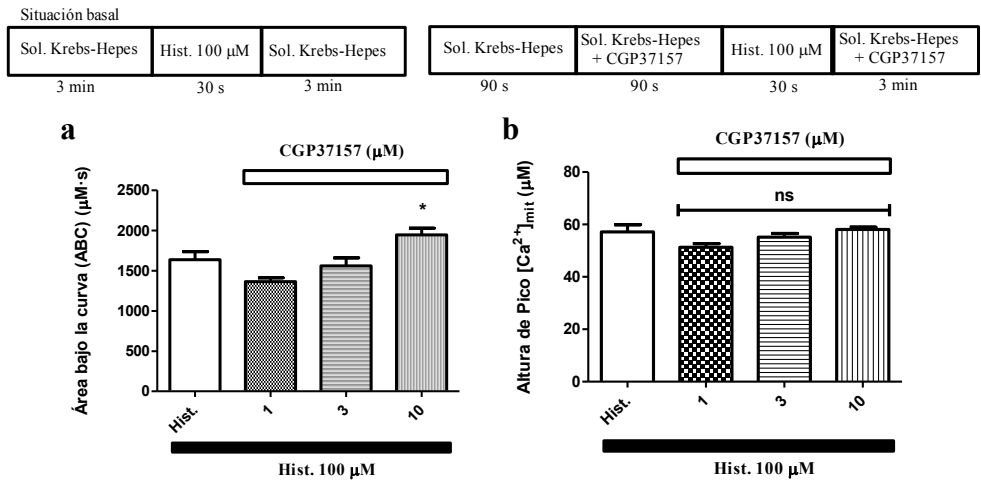
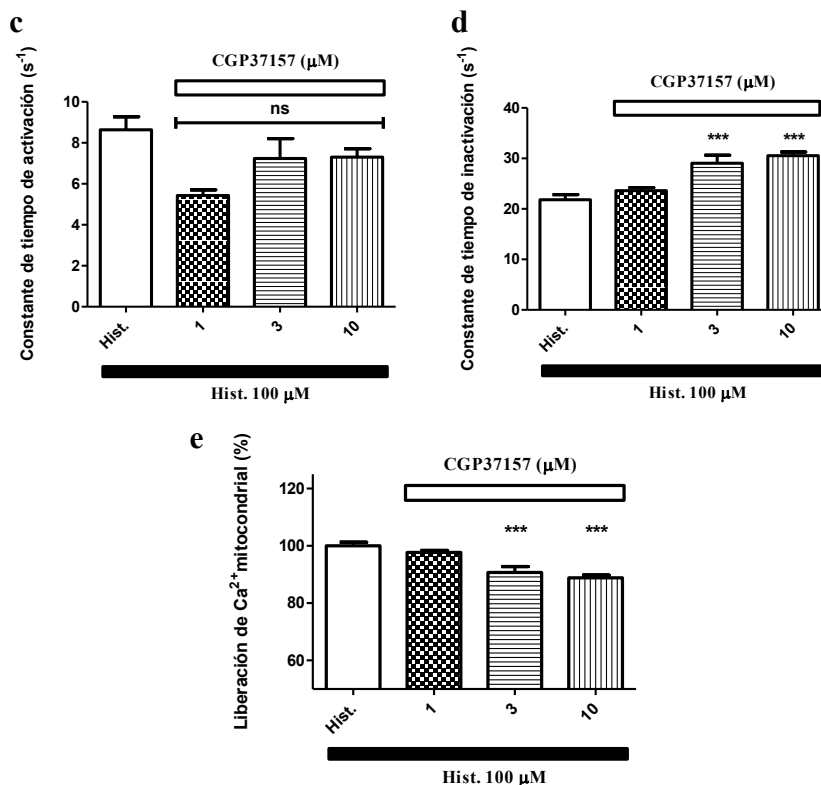


Figura 56 - Parámetros cinéticos analizados.





**Figura 57.** - Evaluación ABC (panel a), altura de pico  $[Ca^{2+}]_{mit}$  (panel b), constante de tiempo de activación mitocondrial (panel c), constante de tiempo de inactivación mitocondrial (panel d) y liberación del  $Ca^{2+}$  mitocondrial (panel e) para CGP37157. El grupo Histamina se considera como el 100% de liberación de  $Ca^{2+}$  por el mNCX en condiciones de funcionamiento normal en ausencia de compuestos. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , con respecto a Histamina.

Como se observa en la **figura 57**, los valores que se obtienen hacen considerar como óptima la concentración de 3  $\mu M$  para poder evaluar todos los compuestos sintetizados, ya que su liberación de  $Ca^{2+}$  mitocondrial es prácticamente parecida que a 10  $\mu M$ . La liberación de  $Ca^{2+}$  mitocondrial se calcula normalizando los valores que se obtienen de constante de tiempo de inactivación mitocondrial. Se considera el valor de histamina como el 100% de liberación y desde ese valor se normaliza la constante de tiempo de inactivación mitocondrial.

5.4.1.1. - Evaluación de los derivados *bencénicos* (15-25)

Los experimentos realizados con los 11 derivados **bencénicos** de **CGP37157**, compuestos **15-25**, han mostrado los siguientes resultados frente al estímulo de histamina en este modelo experimental (**figura 58**)

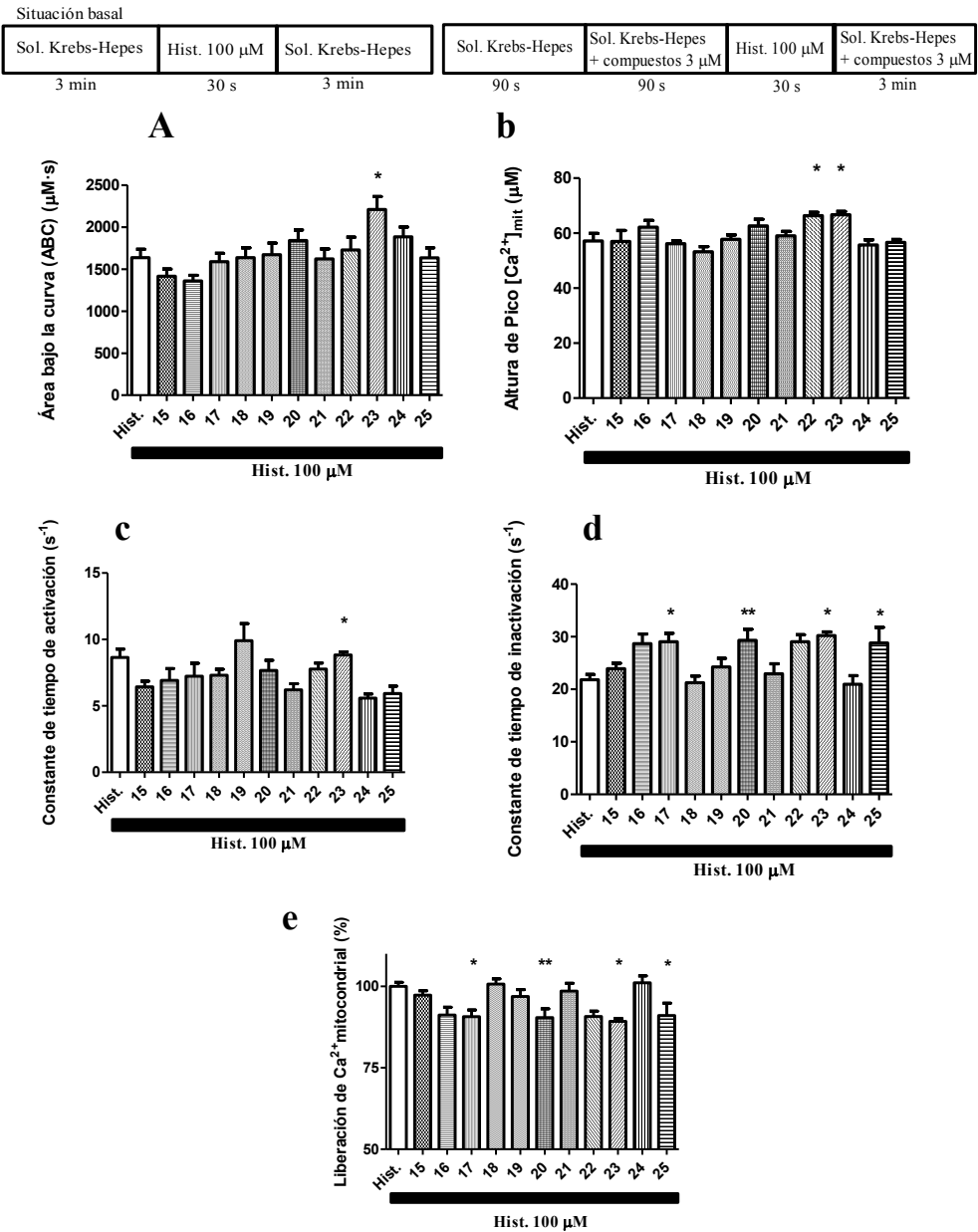


Figura 58. - Evaluación del ABC (panel a), altura de Pico [ $\text{Ca}^{2+}$ ]<sub>mit</sub> (panel b), constante de tiempo de activación mitocondrial (panel c), constante de tiempo de inactivación



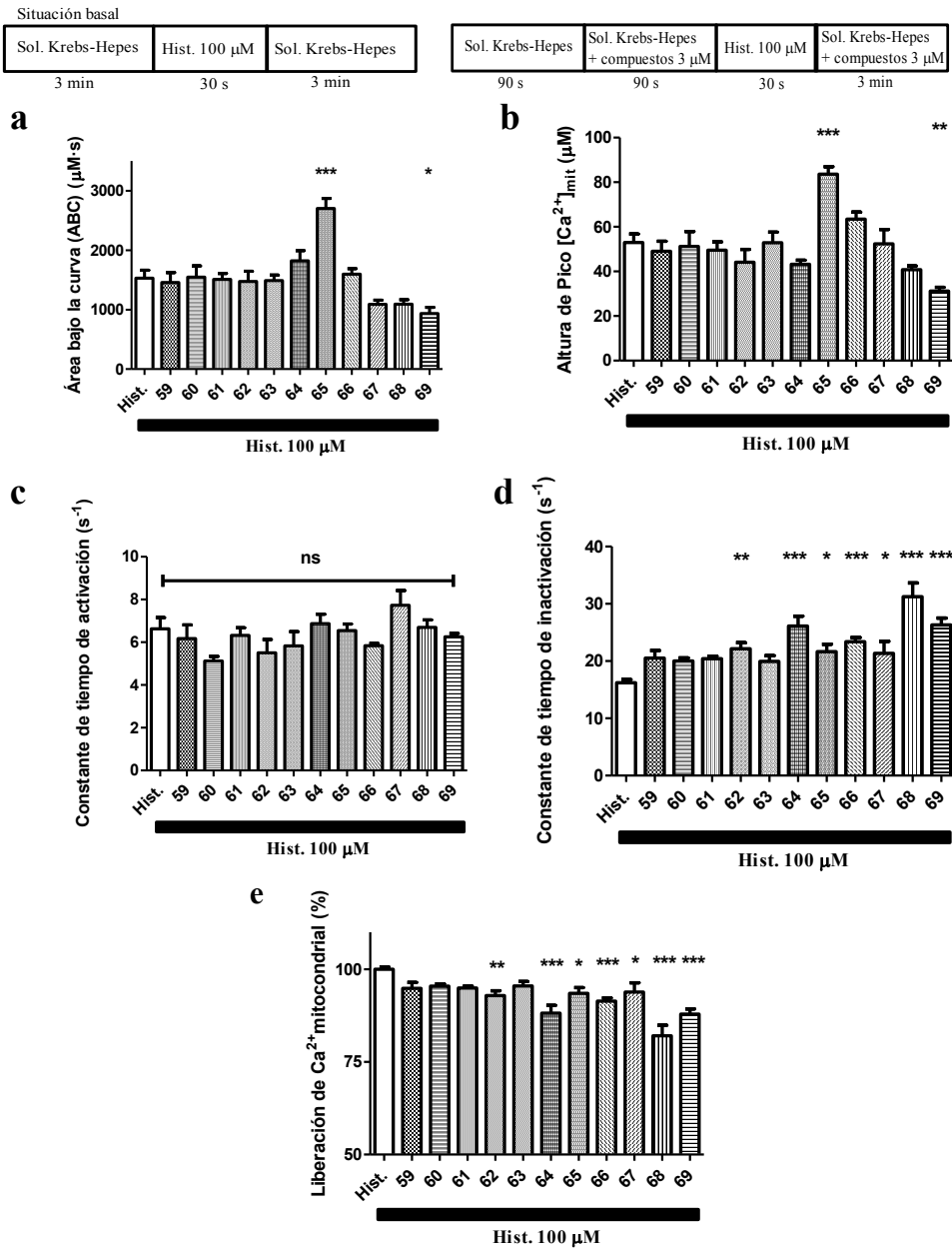
**mitocondrial (panel d) y liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (panel e) para los compuestos a evaluar a 3  $\mu\text{M}$ .** El grupo Histamina se considera como el 100% de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por el mNCX en condiciones de funcionamiento normal en ausencia de compuestos. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , con respecto a Histamina.

Debido al efecto de bloqueo del mNCX que presentan algunos de estos compuestos, se aprecia un aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ , ya que el aclaramiento de este ion por parte de la mitocondria se realiza más lentamente. Así, se observa un aumento del área bajo la curva (ABC), del pico máximo de  $\text{Ca}^{2+}$ , y de la constante de inactivación mitocondrial respecto a la condición control de histamina. Estos parámetros cinéticos van a aportar información acerca de las características del bloqueo del mNCX. Así, el ABC aportará la información del bloqueo producido por los compuestos, dado que el aumento de dicho parámetro es señal de que el  $\text{Ca}^{2+}$  está más tiempo en el interior mitocondrial (**panel a**). La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  máxima que se produce dentro de la mitocondria es medida con la altura de pico de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$ . Así, los compuestos que mayor efecto tengan sobre el mNCX verán aumentada la altura de pico de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$  (**panel b**). La constante de inactivación mitocondrial da información acerca del efecto de bloqueo directo que tienen nuestros compuestos frente al mNCX, pues una mayor constante es indicativo de un mayor tiempo de aclarado por parte de la mitocondria, por la reducción de la actividad del mNCX (**panel d**).

De todos los derivados bencénicos de **CGP37157**, aquel que obtuvo diferencias significativas y mejores valores mostró en el todos los parámetros cinéticos fue el compuesto **23**, por lo que se decidió que era el candidato más óptimo para evaluar el efecto de bloqueo del mNCX de manera directa en mitocondrias "*in situ*", según el protocolo descrito en el apartado 4.5.3.

5.4.1.2. - Evaluación de los derivados *piridínicos* (59-69)

Los experimentos realizados con los 11 derivados **piridínicos** de **CGP37157**, compuestos **59-69**, han mostrado los siguientes resultados frente al estímulo de histamina en este modelo experimental (**figura 59**)

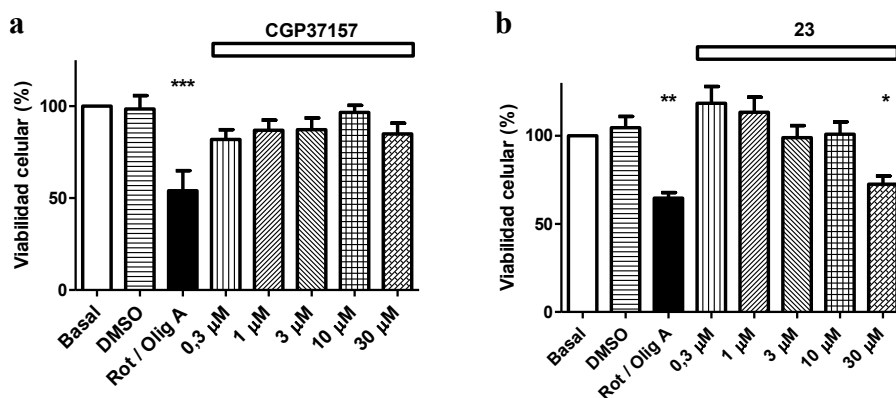


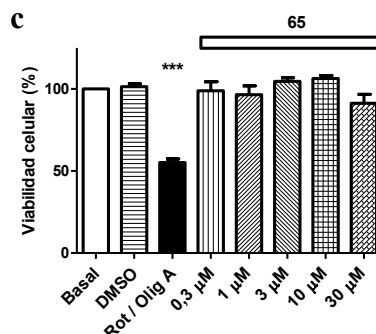
**Figura 59. - Evaluación del ABC (panel a), altura de pico  $[Ca^{2+}]_{mit}$  (panel b), constante de tiempo de activación mitocondrial (panel c), constante de tiempo de inactivación mitocondrial (panel d) y liberación del  $Ca^{2+}$  mitocondrial (panel e) para los compuestos a evaluar a 3  $\mu M$ . El grupo Histamina se considera como el 100% de liberación de  $Ca^{2+}$  por el mNCX en condiciones de funcionamiento normal en ausencia de compuestos. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , con respecto a Histamina.**

De todos los derivados piridínicos de **CGP37157**, aquel que obtuvo diferencias más significativas y mejores valores fue el compuesto **65**, por lo que se decidió que era el candidato más óptimo para evaluar el efecto de bloqueo del mNCX, ya de manera directa en mitocondrias "*in situ*", según el protocolo descrito en el apartado 4.5.3.

#### 5.4.2. - Evaluación de los compuestos frente al bloqueo del mNCX en mitocondrias "*in situ*"

Antes de evaluar la capacidad de bloqueo del mNCX por parte de los compuestos **CGP37157**, **23** y **65**, se quiso evaluar la posible toxicidad "*per se*" de los mismos en células HeLa, a diferentes concentraciones (0,3  $\mu M$  hasta 30  $\mu M$ ) usando como control de muerte celular el coctel tóxico Rot/Olig. A.

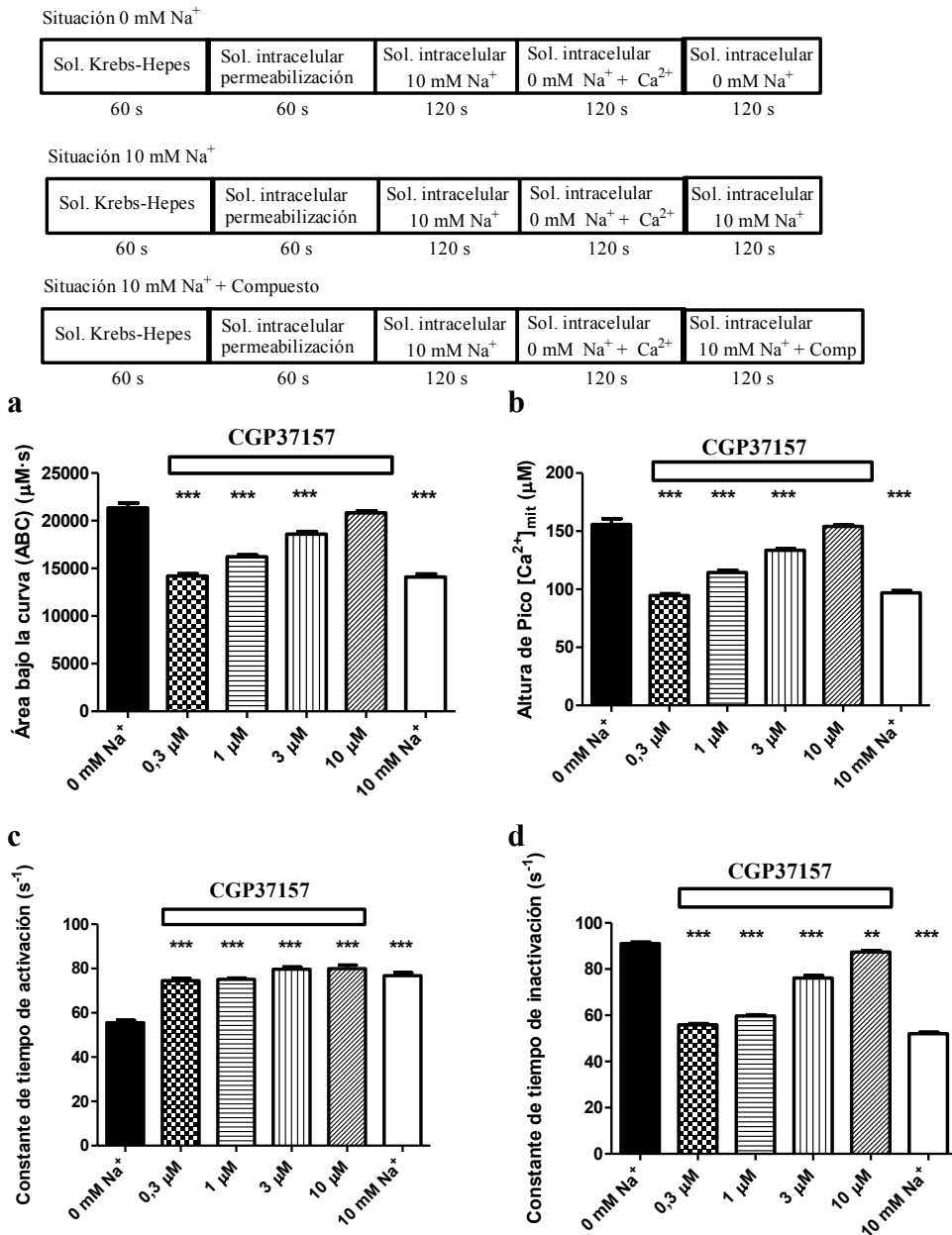




**Figura 60.** - Ensayo de reducción de MTT en células HeLa sometidas a CGP37157, **23** y **65** y como control de muerte el estímulo tóxico Rot/Olig. A. El grupo basal se consideró como la máxima viabilidad (100%), y representa la viabilidad del cultivo en presencia solo del medio de cultivo. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de cuatro experimentos en triplicado; cada experimento se realizó en diferentes pases de células; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , con respecto a solamente a Basal.

Las concentraciones de **CGP37157** y de **65** en el rango 0,3 - 30  $\mu\text{M}$  no disminuyeron la viabilidad celular con respecto a la basal durante las 24 h de incubación de forma significativa. Sin embargo, el compuesto **23** a 30  $\mu\text{M}$ , por sí mismo, muestra un marcado efecto tóxico (alrededor del 40% de reducción de viabilidad) (**figura 60**). En consecuencia, sabemos que a partir de esa última concentración el compuesto **23**, en células HeLa, tiene un carácter citotóxico.

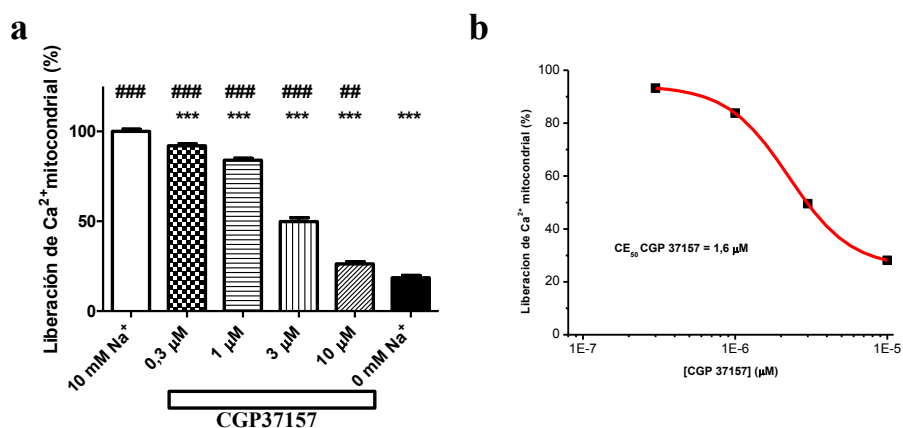
Se procedió a evaluar el efecto directo sobre el mNCX, según el protocolo explicado en el procedimiento experimental (apartado 4.5.3), del compuesto cabeza de serie **CGP37157**, obteniéndose los siguientes resultados;



**Figura 61. - Evaluación del ABC (panel a), altura de pico [Ca<sup>2+</sup>]<sub>mit</sub> (panel b), constante de tiempo de activación mitocondrial (panel c), constante de tiempo de inactivación mitocondrial (panel d) para CGP37157 a diferentes concentraciones. El grupo 10 mM Na<sup>+</sup> se consideró un funcionamiento fisiológico del mNCX y el grupo 0 mM Na<sup>+</sup> se consideró un funcionamiento anómalo o parada del mNCX. El resto de barras son debidas a las condiciones de funcionamiento del mNCX en presencia de diferentes concentraciones del compuesto. Los datos**

son medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; \*\*\* $p < 0,001$ , con respecto a 0 mM  $\text{Na}^+$ .

En la **figura 61** se muestran los parámetros cinéticos medidos para **CGP37157** en base a todas las concentraciones que se han realizado. Se puede observar una clara concentración dependencia en todos los parámetros cinéticos, por lo que a mayor concentración, mayor ABC (**panel a**), mayor altura de pico  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mit}}$  (**panel b**) y mayor constante de inactivación mitocondrial (**panel d**), por estar el mNCX parcialmente bloqueado.

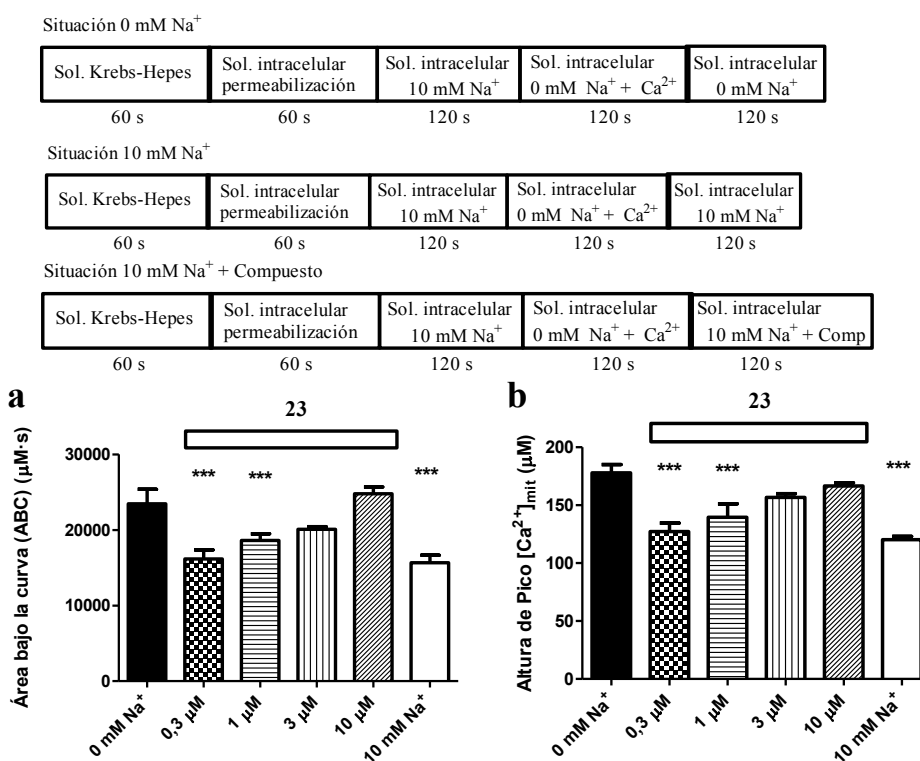


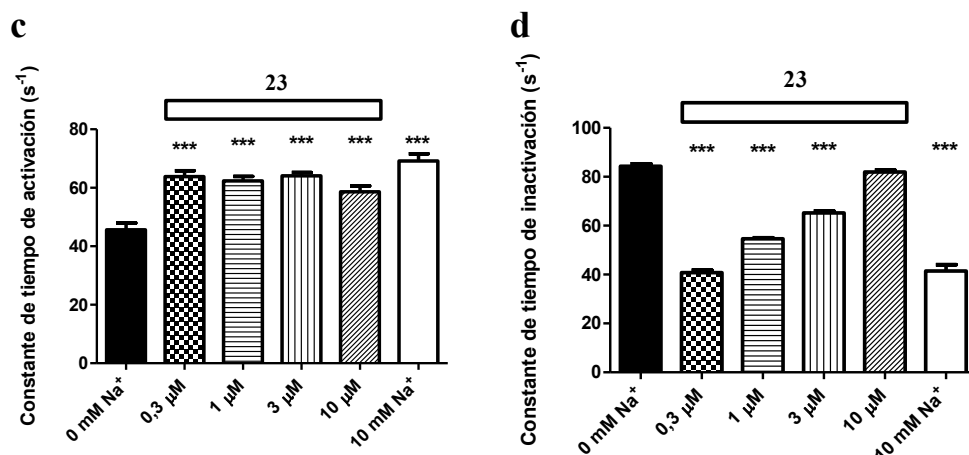
**Figura 62.** - (panel a) Evaluación de la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  en función del compuesto **CGP37157** evaluado en células HeLa. El grupo 10 mM  $\text{Na}^+$  se consideró un funcionamiento fisiológico del mNCX y el grupo 0 mM  $\text{Na}^+$  se consideró un funcionamiento de parada del mNCX. El resto de barras son debidas a las condiciones de funcionamiento del mNCX en presencia de diferentes concentraciones del compuesto. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; \*\*\* $p < 0,001$ , con respecto a 10 mM  $\text{Na}^+$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , con respecto a 0 mM  $\text{Na}^+$ . (panel b). Representación logarítmica de la curva  $\text{CE}_{50}$  para el **CGP37157**.

En base a los datos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  que presenta **CGP37157**, se aprecia una clara concentración-dependencia, a mayor concentración del compuesto, menor es la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte de la mitocondria. Si calculamos el valor de  $\text{CE}_{50}$  para este compuesto en este tipo celular se obtiene un valor de **1,6 μM**, que concuerda con el valor que se sabe que tiene este compuesto en la bibliografía<sup>[161]</sup>.

#### 5.4.2.1. - Evaluación del derivado **bencénico** (**23**)

Siendo el compuesto **23** el compuesto más prometedor en el cribado realizado por histamina en células HeLa, se procedió a evaluar su efecto directo sobre el intercambiador mNCX según el protocolo explicado en el procedimiento experimental (apartado 4.5.3), comparándolo con el efecto producido por el cabeza de serie **CGP37157**, en las mismas condiciones.

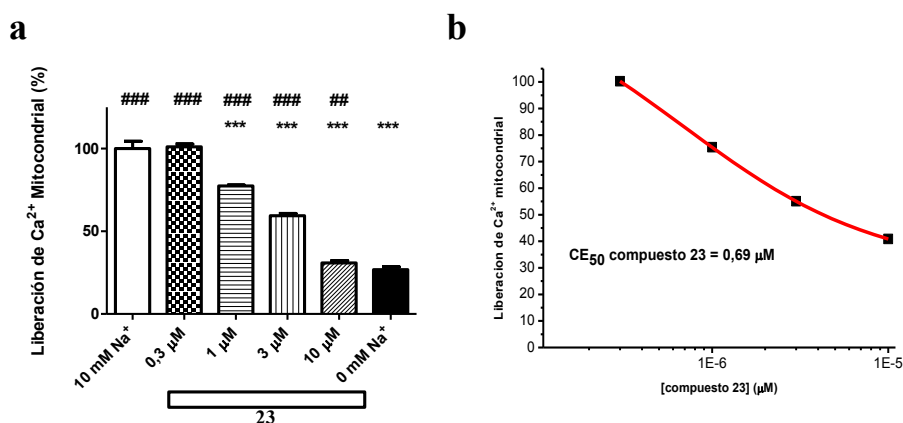




**Figura 63.** - Evaluación del ABC (panel a), altura de pico  $[Ca^{2+}]_{mit}$  (panel b), constante de tiempo de activación mitocondrial (panel c), constante de tiempo de inactivación mitocondrial (panel d) para **23** a diferentes concentraciones. El grupo 10 mM  $Na^+$  se consideró un funcionamiento fisiológico del mNCX y el grupo 0 mM  $Na^+$  se consideró un funcionamiento anómalo o parada del mNCX. El resto de barras son debidas a las condiciones de funcionamiento del mNCX en presencia de diferentes concentraciones del compuesto. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; \*\*\* $p < 0.001$ , con respecto a 0 mM  $Na^+$ .

En la **figura 63** se muestran los parámetros cinéticos medidos para el compuesto **23**. Se puede observar una clara concentración dependencia, por lo que a mayor concentración, mayor ABC (**panel a**), mayor altura de pico  $[Ca^{2+}]_{mit}$  (**panel b**) y mayor constante de inactivación mitocondrial (**panel d**) por estar el mNCX parcialmente bloqueado.





**Figura 64.** - (panel a) Evaluación de la liberación del Ca<sup>2+</sup> en función del compuesto **23** evaluado en células HeLa. El grupo 10 mM Na<sup>+</sup> se consideró un funcionamiento fisiológico del mNCX y el grupo 0 mM Na<sup>+</sup> se consideró un funcionamiento de parada del mNCX. El resto de barras son debidas a las condiciones de funcionamiento del mNCX en presencia de diferentes concentraciones del compuesto. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; \*\*\*p<0,001, con respecto a 10 mM Na<sup>+</sup>, ##p<0,01, ###p<0,001, con respecto a 0 mM Na<sup>+</sup>. (panel b). Representación logarítmica de la curva CE<sub>50</sub> para el compuesto **23**.

En base a los datos de liberación de Ca<sup>2+</sup> que presenta el compuesto **23**, se aprecia una clara concentración-dependencia, a mayor concentración del compuesto, menor es la liberación de Ca<sup>2+</sup> por parte de la mitocondria. Si calculamos el valor de CE<sub>50</sub> para este compuesto, en este tipo celular, se obtiene un valor de **0,69 μM**.

#### 5.4.2.2. - Evaluación del derivado *piridínico* (**65**)

El compuesto **65** es el que mejor propiedades como bloqueante del mNCX posee de la familia de derivados piridínicos según los experimentos realizados con histamina. Así, se procedió a evaluar su efecto directo sobre el intercambiador mNCX según el protocolo explicado en el procedimiento experimental (apartado 4.5.3) comparándolo con el efecto producido por el cabeza de serie **CGP37157**, en las mismas condiciones.

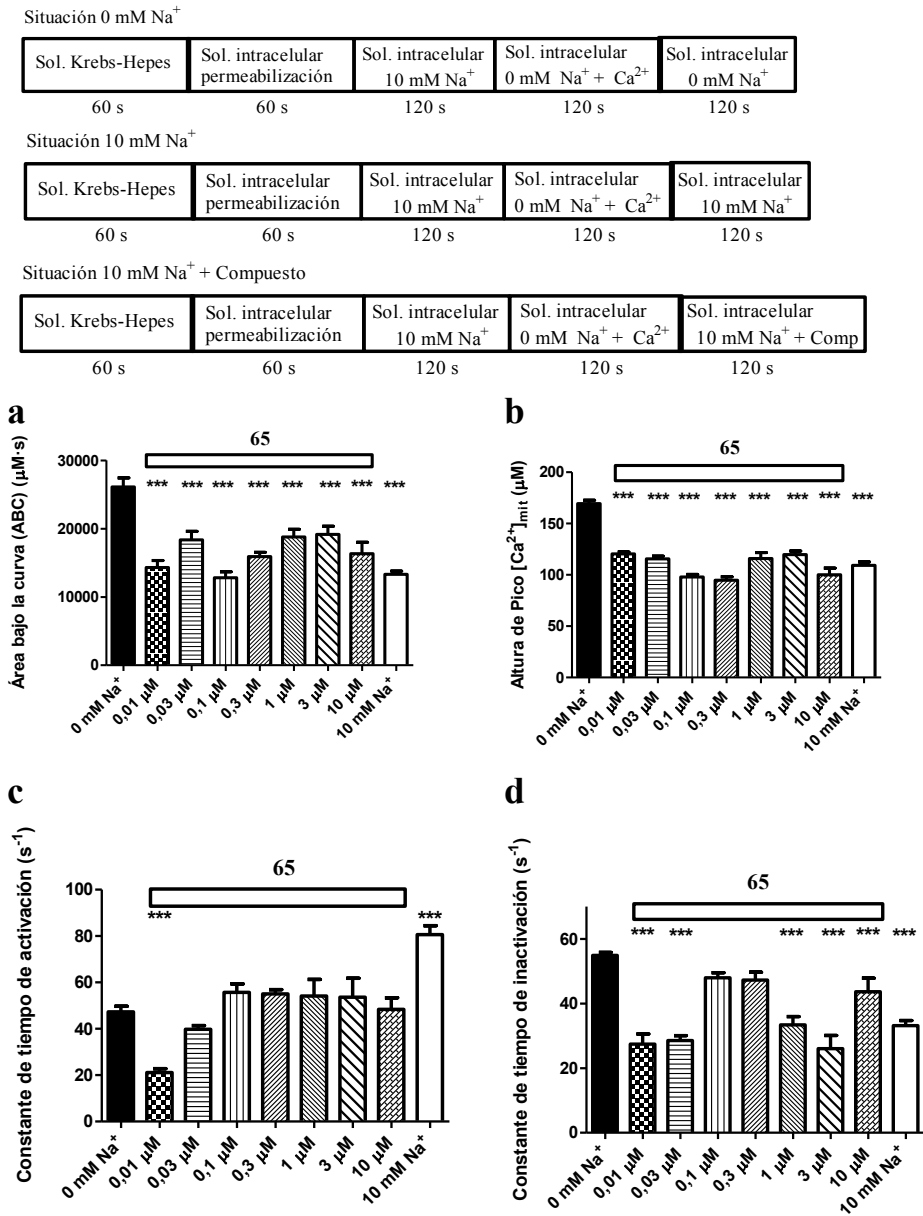
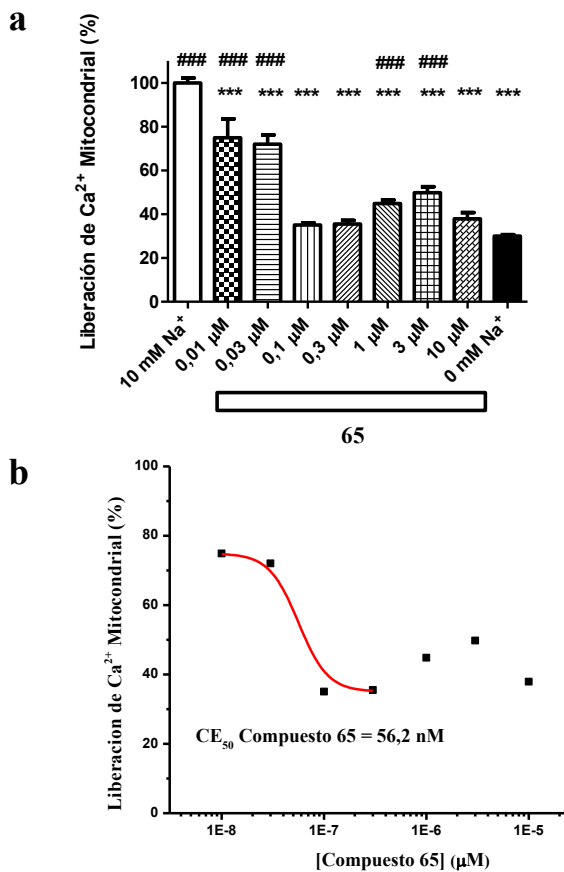


Figura 65. - Evaluación del ABC (panel a), altura de pico [Ca<sup>2+</sup>]<sub>mit</sub> (panel b), constante de tiempo de activación mitocondrial (panel c), constante de tiempo de inactivación mitocondrial (panel d) para 65 a diferentes concentraciones. El grupo 10 mM Na<sup>+</sup> se consideró un funcionamiento fisiológico del mNCX y el grupo 0 mM Na<sup>+</sup> se consideró un funcionamiento anómalo o parada del mNCX. El resto de barras son debidas a las condiciones de funcionamiento del mNCX en presencia de diferentes concentraciones del compuesto. Los datos

son medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; \*\*\* $p < 0,001$ , con respecto a 0 mM  $\text{Na}^+$ .

En la **figura 65** se muestran los parámetros cinéticos medidos para el compuesto **65** en base a todas las concentraciones que se han realizado. En este caso la concentración dependencia se encuentra a concentraciones bajas, 10 - 30 nM, perdiéndose a concentraciones mayores, al contrario que lo que ocurría en el caso de **CGP37157** y compuesto **23**.



**Figura 66. - (panel a) Evaluación de la liberación del  $\text{Ca}^{2+}$  en función del compuesto 65 evaluado en células HeLa.** El grupo 10 mM  $\text{Na}^+$  se consideró un funcionamiento fisiológico del mNCX y el grupo 0 mM  $\text{Na}^+$  se consideró un funcionamiento de parada del mNCX. El resto de barras son debidas a las condiciones de funcionamiento del mNCX en presencia de diferentes concentraciones del compuesto. Los datos son medias  $\pm$  S.E.M. de al menos cuatro experimentos en triplicado; \*\*\* $p < 0,001$ , con respecto a 10 mM  $\text{Na}^+$ , ### $p < 0,001$ , con respecto a 0 mM  $\text{Na}^+$ . **(panel b). Representación logarítmica de la curva  $\text{CE}_{50}$  para el compuesto 65.**

En base a los datos de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  que presenta el compuesto **65**, se ve una tendencia de concentración-dependencia, concentraciones bajas del compuesto **65**, (10 - 30 nM) producen una salida de  $\text{Ca}^{2+}$  casi parecida a la condición fisiológica, pero concentraciones de 0,1 - 0,3  $\mu\text{M}$  bloquean en un 80% el mNCX, revertiéndose ligeramente esta situación en el rango de concentraciones de 1 - 10  $\mu\text{M}$ . Por lo que el mayor efecto bloqueante sobre el mNCX se ejerce dentro del rango de 0,01 - 0,1  $\mu\text{M}$ . Si calculamos el valor de  $\text{CE}_{50}$  para este compuesto, en este tipo celular, se obtiene un valor de **56,2 nM**.

**Tabla 22. - Valores de  $\text{CE}_{50}$  para los compuestos CGP37157, 23 y 65**

	$\text{CE}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )
<b>CGP37157</b>	<b>1,6 <math>\pm</math> 0,03</b>
<b>23</b>	<b>0,69 <math>\pm</math> 0,01</b>
<b>65</b>	<b>0,056 <math>\pm</math> 0,001</b>

En base a los experimentos de neuroprotección que se han realizado, se observa que **CGP37157** es un buen agente neuroprotector dado que protege frente a estímulos de VTD (76%  $\pm$  3), estímulo de alto  $\text{K}^+$  (36%  $\pm$  3) y sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  frente a Glu (37%  $\pm$  9). En estos eventos fisiológicos está involucrada la mitocondria, por lo que la protección viene mediada por la acción de este compuesto sobre la modulación del mNCX. Cuando realizamos un cambio de sustituyente, mayor volumen estérico, el compuesto **23** mejora los resultados de neuroprotección, VTD (59%  $\pm$  5), estímulo de alto  $\text{K}^+$  (36%  $\pm$  3) y sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  frente a Glu (48%  $\pm$  6) y Rot/Olig A. (39%  $\pm$  6) respecto al cabeza de serie. Además el compuesto **23** presenta una mejora frente al bloqueo del mNCX, siendo posible la mejor neuroprotección por la acción sobre esta diana farmacológica. Al introducir un anillo de piridina y cambiar el sustituyente a una posición, a priori, no favorable para la actividad de las 4,1-benzotiazepinas, las propiedades neuroprotectoras del compuesto **65**, se ven mermadas respecto al cabeza de serie, estímulo de alto  $\text{K}^+$  (27%  $\pm$  4) y Rot/Olig A. (24%  $\pm$  5), pero se consigue un bloqueo del mNCX a concentraciones

nanomolares. Este mayor bloqueo del mNCX no resulta tóxico para la célula como se deduce de los experimentos de toxicidad "*per-se*" en células HeLa para el compuesto **65**.

Queda demostrado que pequeñas modificaciones en **CGP37157** mejoran la neuroprotección, compuesto **23**, pero si esas modificaciones son muy elevadas o drásticas, compuesto **65**, se pierde la neuroprotección pero no significa que se vuelva tóxico para la célula, sino que demuestra el fino papel que ejerce la modulación del mNCX en el perfil neuroprotector.

Como se ha comentado, muchas enfermedades neurodegenerativas vienen producidas por determinadas proteinopatías, TDP-43,  $\beta$ A, *Htt<sup>exp</sup>*,  $\alpha$ -sin, etc. produciendo una circulación aberrante del  $\text{Ca}^{2+}$  y afectando de manera significativa a la mitocondria generando diferentes eventos fisiopatológicos en ella. **CGP37157** es un compuesto multitiana que actúa a nivel mitocondrial, siendo su diana el mNCX, y a nivel de membrana plasmática, bloqueo de CCVD, r-NMDA, por eso su gran versatilidad a la hora de producir efectos neuroprotectores. Con el fin de mejorar y hacer más selectiva la acción de dicho compuesto se propuso la síntesis de nuevos derivados, obteniéndose el compuesto **23** y **65**.

Se ha comprobado que el compuesto **23** produce una mejora en el bloqueo del mNCX y una mejora en las propiedades neuroprotectoras frente al cabeza de serie debido a que puede ser más o menos específico frente a todas las dianas involucradas en estos procesos. Por el contrario, el compuesto **65** no obtiene mejoras en los resultados de neuroprotección pero si mejora mucho el bloqueo del mNCX haciendo que dicho compuesto sea más selectivo hacia esta diana mitocondrial. Debido a esto se ha conseguido abrir las puertas hacia un compuesto que sea más selectivo y se centre en una única diana y pudiendo ser

utilizado como herramienta para nuevas líneas de investigación relacionadas con la mitocondria, tales como hipoxia y generación de ROS<sup>[162]</sup>.

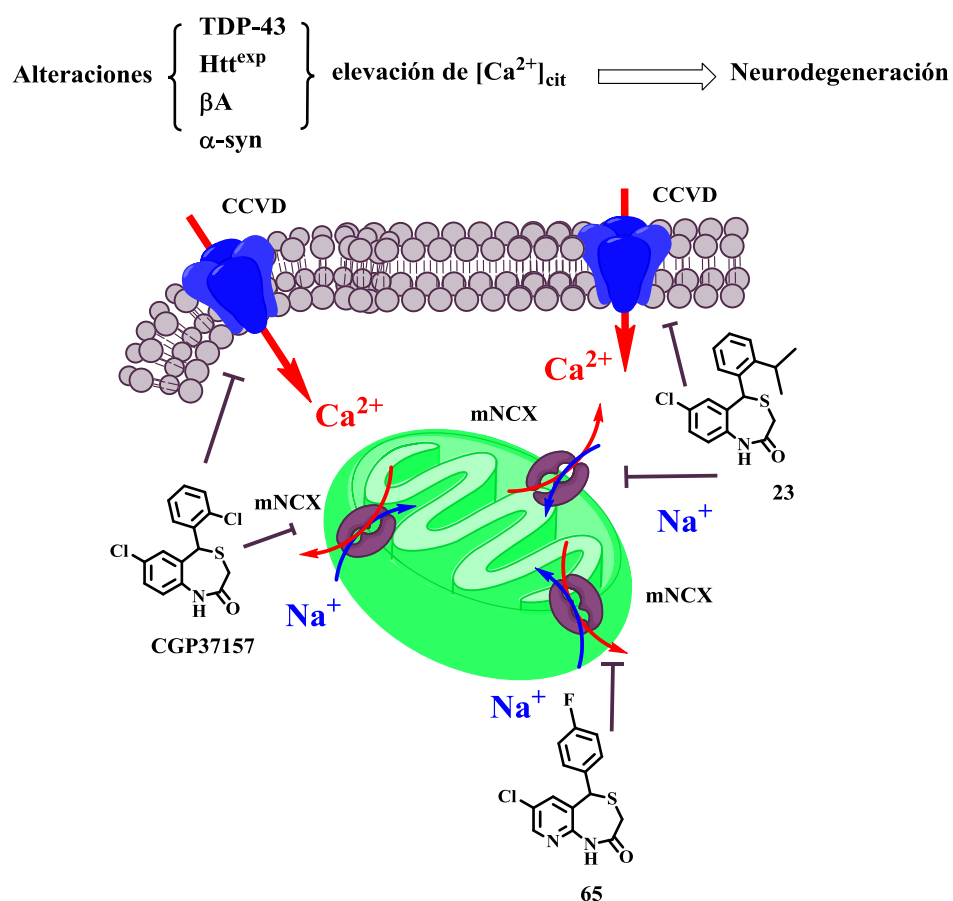


Figura 67. - Resumen esquemático de los efectos que generan los compuestos CGP37157, 23 y 65 en mitocondria y receptores de membrana.

<sup>162</sup> Hernansanz-Agustín, P.; Izquierdo-Álvarez, A.; Sánchez-Gómez, F.J.; Ramos, E.; Villa-Peña, T.; Lamas, S.; Bogdanova, A.; Martínez-Ruiz, A. (2014) Acute hypoxia produces a superoxide burst in cell. *Free Radical Biology and Medicine*. **71**:146-156.

## 5.5. - Bibliografía

- [139] Abdessamad, A.; Schmidt, F.; Sarr, M.; Decaudin, D.; Florent, J.C.; Johannes, L. (2008) Synthesis and Properties of a Mitochondrial Peripheral Benzodiazepine Receptor Conjugate. *Chem. Med. Chem.* **3**:1687-1695.
- [140] Smith, M.B. (2010) Organic Synthesis (Third Edition) Chapter 7, Protecting Groups, *Academic Press, Elsevier*. pages 587-622.
- [141] Gschwend, H.W.; Rodriguez, H.R. (2005) Heteroatom-Facilitated Lithiations *Organic Reactions*. **26**:1:1-360.
- [142] Clayden, J. (2002) Organolithiums: Selectivity for Synthesis. Ed. *Pergamon*.
- [143] Balci, M. (2005) Basic  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectroscopy, 1st Edition. *Elsevier Science*.
- [144] Turner, J.A. (1983) Regiospecific Electrophilic Substitution of Aminopyridines: Ortho Lithiation of 2-, 3-, and 4-(Pivaloylamino)pyridines. *J. Org. Chem.* **48**:3401-3408.
- [145] Kilpatrick, D.L.; Slepatis, R.J.; Corcoran, J.J.; Kirshner, N. (1982) Calcium uptake and catecholamine secretion by cultured bovine adrenal medulla cells. *J. Neurochem.* **38**:427-435.
- [146] Jordán, J.; Galindo, M.F.; Calvo, S.; González-García, C.; Ceña, V. (2000) Veratridine induces apoptotic death in bovine chromaffin cells through superoxide production. *Br. J. Pharmacol.* **130**:1496-1504.
- [147] Nicolau, S.M.; de Diego, A.M.G.; Cortés, L.; Egea, J.; González, J.C.; Mosquera, M.; López, M.G.; Hernández-Guijo, J.M.; García, A.G. (2009) Mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Exchanger blocker CGP37157 protects against chromaffin cell death elicited by veratridine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**:844-872.
- [148] González-Lafuente, L.; Egea, J.; León, R.; Martínez-Sanz, F.J.; Monjas, L.; Perez, C.; Merino, C.; García-De Diego, A.M.; Rodríguez-Franco, M.I.; García, A.G.; Villarroja, M.; López, M.G.; De Los Ríos, C. (2012) Benzothiazepine CGP37157 and its isosteric 2'-methyl analogue provide neuroprotection and block cell calcium entry. *ACS. Chem. Neurosci.* **3**:519-529.
- [149] Cano-Abad, M.F.; Villarroja, M.; García, A.G.; Gabilan, N.H.; López, M.G. (2001) Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J. Biol. Chem.* **276**:39695-39704.

- [150] Neumann, J.T.; Diaz-Sylvester, P.L.; Fleischer, S.; Copello, J.A. (2011) CGP37157 inhibits the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase and activates ryanodine receptor channels in striated muscle. *Mol. Pharmacol.* **79**:141-147.
- [151] Ruiz, A.; Alberdi, E.; Matute, C. (2014) CGP37157, an inhibitor of the mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, protects neurons from excitotoxicity by blocking voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Cell Death Dis.* **5**:e1156.
- [152] Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* **1**:623-634.
- [153] Abramov, A.Y.; Duchen, M.R. (2010) Impaired mitochondrial bioenergetics determines glutamate-induced delayed calcium deregulation in neurons. *Biochim. Biophys. Acta.* **1800**:297-304.
- [154] Stout, A.K.; Raphael, H.M.; Kanterewicz, B.I.; Klann, E.; Reynolds, I.J. (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat. Neurosci.* **1**:366-373.
- [155] a) Stanika, R.I.; Pivovarova, N.B.; Brantner, C.A.; Watts, C.A.; Winters, C.A.; Andrews, S.B. (2009) Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**:9854-9859. b) Starkov, A.A.; Chinopoulos, C.; Fiskum, G. (2004) Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium.* **36**:257-264.
- [156] Wang, K.K. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* **23**:20-26.
- [157] a) Brewer, L.D.; Thibault, O.; Staton, J.; Thibault, V.; Rogers, J.T.; García-Ramos, G. (2007) Increased vulnerability of hippocampal neurons with age in culture: temporal association with increases in NMDA receptor current, NR2A subunit expression and recruitment of L-type calcium channels. *Brain. Res.* **1151**:20-31. b) Prehn, J.H.; Lippert, K.; Kriegstein, J. (1995) Are NMDA or AMPA/kainate receptor antagonists more efficacious in the delayed treatment of excitotoxic neuronal injury? *Eur. J. Pharmacol.* **292**:179-189.
- [158] Nicolau, S.M.; Egea, J.; López, M.G.; García, A.G. (2010) Mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, a new target for neuroprotection in rat hippocampal slices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**:140-144.
- [159] Olanow, C.A. (1993) A Radical Hypothesis for neurodegeneration. *TINS.* **16**:439-444.



- [160] Galkin, A.; Abramov, A.Y.; Frakich, N.; Duchon, M.R.; Moncada, S. **(2009)** Lack of oxygen deactivates mitochondrial complex I: implications for ischemic injury? *J. Biol. Chem.* **284**:36055-36061.
- [161] Hernández-SanMiguel, E.; Vay, L.; Santo-Domingo, J.; Lobatón, C.D.; Moreno, A.; Montero, M.; Alvarez, J. **(2006)** The mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger plays a key role in the control of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *Cell Calcium.* **40**:53-61.
- [162] Hernansanz-Agustín, P.; Izquierdo-Álvarez, A.; Sánchez-Gómez, F.J.; Ramos, E.; Villa-Peña, T.; Lamas, S.; Bogdanova, A.; Martínez-Ruiz, A. **(2014)** Acute hypoxia produces a superoxide burst in cell. *Free Radical Biology and Medicine.* **71**:146-156.



## 6. - Conclusiones

---

### 6.1. - Conclusiones

203



## 6. - Conclusiones

### 6.1. - Conclusiones

De los resultados presentados en esta tesis doctoral se puede extraer las siguientes conclusiones;

El método de síntesis utilizado ha proporcionado un fácil acceso a benzoderivados de **CGP37157** con las sustituciones propuestas, con rendimientos medios y en tres pasos sintéticos. El método propuesto para la síntesis de los piridoderivados de **CGP37157**, aunque con más pasos sintéticos que su homóloga bencénica, nos aporta los productos deseados con buenos rendimientos de los productos finales.

Los benzoderivados de **CGP37157** evaluados para ver el efecto neuroprotector frente a un modelo de muerte por sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (veratridina) han reportado buenos resultados con respecto al cabeza de serie, pero los piridoderivados no logran mejorar los datos respecto al cabeza de serie.

Los benzoderivados de **CGP37157** evaluados para ver el efecto neuroprotector frente a un modelo de muerte frente a alto  $\text{K}^+$  bloquean eficazmente la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  con una eficacia similar a los inhibidores de CCVD tipo nifedipino. Los piridoderivados actúan de manera parecida a sus homólogos bencénicos frente a este estímulo tóxico mejorando así la protección.

Los benzoderivados de **CGP37157** regulan los transientes citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por glutamato, son capaces de reducir significativamente la excitotoxicidad producida por el aumento de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cit}}$  por una inhibición del

mNCX. Los piridoderivados de **CGP37157** no logran, en su gran mayoría, mejorar los datos de protección de este modelo respecto al cabeza de serie.

Se sabe que **CGP37157** no es un buen agente antioxidante respecto al estímulo tóxico de Rot/Olig. A, en cambio los benzoderivados y piridoderivados de **CGP37157** son capaces de mejorar los datos de protección frente a este modelo de estrés oxidativo mostrando así sus buenas propiedades antioxidantes.

Respecto a la neuroprotección se ha visto que los benzoderivados han mostrado mejor perfil neuroprotector en los cuatro modelos ensayados respecto a sus homólogos piridínicos, pero aun así, estos piridoderivados han mostrado buenos perfiles neuroprotectores a la vez que se ha mejorado el perfil farmacocinético.

Hemos demostrado que el protocolo de histamina nos proporciona buenos datos preliminares acerca del posible efecto bloqueante del mNCX de manera rápida y eficaz. De los datos de los experimentos de histamina, hemos podido calcular los efectos de bloqueo del mNCX de los mejores compuestos que dieron respuesta en este protocolo, compuesto **23** y **65**, comparándolos con **CGP37157**.

Los compuestos **23** y **65** mejoran considerablemente el bloqueo del mNCX respecto al **CGP37157**. Se ha observado que un bloqueo muy potente del mNCX, compuesto **65**, no mejora la neuroprotección mediada por esta diana, en cambio el compuesto **23** consigue mejorar dicha neuroprotección mejorando también el bloqueo del mNCX.

Se sabe que el mNCX contribuye de manera significativa e importante a la neuroprotección en diversas patologías. El hecho de bloquear de manera muy efectiva este intercambiador no significa que se produzca un daño neurotóxico

para la célula, solo que el mNCX está regulando de manera específica y selectiva la neuroprotección.





## 7. - Bibliografía

---

### 7.1. - Bibliografía

209



## 7. - Bibliografia

### 7.1. - Bibliografia

- [1] Berridge, M.J.; Bootman, M.D.; Roderick, H.L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**:7:517-529.
- [2] Berridge, M.J. (1997) Elementary and global aspects of calcium signaling. *J. Exp. Biol.* **200**:2:315-319.
- [3] Carafoli, E. (2005) Calcium -a universal carrier of biological signal. *FEBS Journal.* **272**:1073-1089.
- [4] Guerini, D.; Coletto, L.; Carafoli, E. (2005) Exporting calcium from cells. *Cell Calcium.* **38**:3-4:281-289.
- [5] Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2002) Molecular Biology of the Cell 4<sup>a</sup> edition, *Science.* 767-829.
- [6] Vasington, F.D. (1963) Calcium ion uptake by fragments of rat liver mitochondria and its dependence on electron transport. *J. Biol. Chem.* **238**:1841-1847.
- [7] Carafoli, E. (1979) The calcium cycle of mitochondria. *FEBS Lett.* **104**:1-5.
- [8] a) De Stefani, D.; Raffaello, A.; Teardo, E.; Szabò, I.; Rizzuto, R. (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* **476**:7360:336-340. b) Baughman, J.M.; Perocchi, F.; Girgis, H.S.; Plovanich, M.; Belcer-Timme, C.A.; Sancak, Y.; Bao, X.R.; Strittmatter, L.; Goldberger, O.; Bogorad, R.L.; Kotliansky, V.; Mootha, V.K. (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* **476**:7360:341-345.
- [9] Álvarez, J.; Montero, M.; García-Sancho, J. (1999) Subcellular Ca<sup>2+</sup> dynamics. *News Physiol. Sci.* **14**:161-168.
- [10] Hajnóczky, G.; Csordás, G.; Das, S.; García-Pérez, C.; Saotome, M.; Sinha-Roy, S.; Yi, M. (2006) Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in apoptosis. *Cell Calcium.* **40**:5-6:553-560.
- [11] Babcock, D.F.; Hillet, B. (1998) Mitochondrial oversight of cellular Ca<sup>2+</sup> signaling *Curr. Op. Neurobiol.* **8**:398-404.

- [12] Palty, R.; Silverman, W.F.; Hershfinkel, M.; Caporale, T.; Sensi, S.L.; Parnis, J.; Nolte, C.; Fishman, D.; Shoshan-Barmatz, V.; Herrmann, S.; Khananshvili, D.; Sekler, I. **(2010)** NCLX is an essential component of mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**:1:436-41.
- [13] Castaldo, P.; Cataldi, M.; Magi, S.; Lariccia, V.; Arcangeli, S.; Amoroso, S. **(2009)** Role of the mitochondrial sodium/calcium exchanger in neuronal physiology and in the pathogenesis of neurological diseases. *Progress in Neurobiology.* **87**:58-79.
- [14] Zoratti, M.; Szabb, I. **(1995)** The mitochondrial permeability transition. *Biochim. Biophys. Acta.* **1241**:139-176.
- [15] Lemasters, J.J.; Theruvath, T.P.; Zhong, Z.; Nieminen, A.L. **(2009)** Mitochondrial calcium and permeability transition in cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* **1787**:11:1395-1401.
- [16] Wallace, D.C. **(2010)** Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol.* **5**:297-348.
- [17] Smith, R.A.J.; Hartley, R.C.; Cochemé, H.M.; Murphy, M.P. **(2012)** Mitochondrial pharmacology *Trends Phar. Sci.* **33**:6:341-352.
- [18] Rasola, A.; Bernardi, P. **(2011)** Mitochondrial permeability transition in  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* **50**:222-233.
- [19] Atamna, H.; Kumar, R. **(2010)** Protective role of methylene blue in Alzheimer's disease via mitochondria and cytochrome c oxidase. *J. Alzheimer's Dis.* **20**:(Suppl.2):S439-S452.
- [20] Haefeli, R.H.; Erb, M.; Gemperli, A.C.; Robay, D.; Fruh, I.F.; Anklin, C.; Dallmann, R.; Gueven, N. **(2011)** NQO1-dependent redox cycling of idebenone: effects on cellular redox potential and energy levels. *PLoS ONE.* **6**:17963.
- [21] Fash, D.M.; Khmour, O.M.; Sahdeo, S.J.; Goldschmidt, R.; Jaruvangsanti, J.; Dey, S.; Arce, P.M.; Collin, V.C.; Cortopassi, G.A.; Hecht, S.M. **(2013)** Effects of alkyl side chain modification of coenzyme Q10 on mitochondrial respiratory chain function and cytoprotection. *Bioorg. Med.Chem.* **21**:2346-2354.
- [22] Bezprozvanny, I. **(2009)** Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol. Med.* **15**:89-100.
- [23] Abou-Sleiman, P.M.; Muqit, M.M.; Wood, N.W. **(2006)** Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**:207-219.
- [24] Gagliardi, S.; Cova, E.; Davin, A.; Guareschi, S.; Abel, K.; Alvisi, E.; Laforenza, U.; Ghidoni, R.; Cashman, J.R.; Ceroni, M.; Cereda, C. **(2010)** SOD1 mRNA expression in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **39**:2:198-203.

- [25] Monk, P.N.; Shaw, P.J. (2006) ALS: life and death in a bad neighborhood. *Nat. Med.* **12**:885-887.
- [26] Gusella, J.F.; MacDonald, M.E. (2000) Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**:109-115.
- [27] Watase, K.; Barrett, C.F.; Miyazaki, T.; Ishiguro, T.; Ishikawa, K.; Hu, Y.; Unno, T.; Sun, Y.; Kasai, S.; Watanabe, M.; Gomez, C.M.; Mizusawa, H.; Tsien, R.W.; Zoghbi, H.Y. (2008) Spinocerebellar ataxia type 6 knockin mice develop a progressive neuronal dysfunction with age-dependent accumulation of mutant Cav2.1 channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**:11987-11992.
- [28] Giannakopoulos, P.; Kovari, E.; Gold, G.; Von Gunten, A.; Hof, P.R.; Bouras, C. (2009) Pathological substrates of cognitive decline in Alzheimer's disease, *Front. Neurol. Neurosci.* **24**:20-29.
- [29] Hardy, J.; Selkoe, D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science.* **297**:353-356.
- [30] Murray, F.E.; Landsberg, J.P.; Williams, R.J.; Esiri, M.M.; Watt, F. (1992) Elemental analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease using protoninduced X-ray analysis. *Ciba. Found. Symp.* **169**:201-210.
- [31] Hensley, K.; Carney, J.M.; Mattson, M.P.; Aksenova, M.; Harris, M.; Wu, J.F.; Floyd, R.; Butterfield, D.A. (1994) A model for  $\beta$ -amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:3270-3274.
- [32] a) Mark, R.J.; Hensley, K.; Butterfield, D.A.; Mattson, M.P. (1995) Amyloid  $\beta$ -peptide impairs ion-motive ATPase activities: evidence for a role in loss of neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and cell death. *J. Neurosci.* **15**:6239-6249. b) Mark, R.J.; Keller, J.N.; Kruman, I.; Mattson, M.P. (1997) Basic FGF attenuates amyloid  $\beta$ -peptide-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impairment of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in hippocampal neurons. *Brain Res.* **756**:205-214.
- [33] Kawahara, M.; Kuroda, Y. (2000) Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's  $\beta$ -amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis. *Brain Res. Bull.* **53**:389-397.
- [34] Berridge, M.J. (2010) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers. Arch-Eur. J. Physiol.* **459**:441-449.
- [35] Rizzuto, R.; Brini, M.; Murgia, M.; Pozzan, T. (1993) Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to  $\text{IP}_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* **262**:5134-744-747.

- [36] Berridge, M.J. (2011) Calcium Signalling and Alzheimer's Disease. *Neurochem. Res.* **36**:1149-1156.
- [37] Sulzer, D. (2007) Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **30**:244-250.
- [38] Volles, M.J. (2001) Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry.* **40**:7812-7819.
- [39] Danzer, K.M. (2007) Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J. Neurosci.* **27**:9220-9232.
- [40] Furukawa, K. (2006) Plasma membrane ion permeability induced by mutant alpha-synuclein contributes to the degeneration of neural cells. *J. Neurochem.* **97**:1071-1077.
- [41] Surmeier, D.J. (2007) Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* **6**:933-938.
- [42] Chan, C.S. (2007) 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature.* **447**:1081-1086.
- [43] Gandhi, S.; Wood-Kaczmar, A.; Yao, Z.; Plun-Favreau, H.; Deas, E.; Klupsch, K.; Downward, J.; Latchman, D.S.; Tabrizi, S.J.; Wood, N.W.; Duchen, M.R.; Abramov A.Y. (2009) PINK1-associated Parkinson's disease is caused by neuronal vulnerability to calcium-induced cell death. *Mol. Cell.* **33**:627-638.
- [44] Grünwald, A.; Gegg, M.E.; Taanman, J.W.; King, R.H.; Kock, N.; Klein, C.; Schapira, A.H.V. (2009) Differential effects of PINK1 nonsense and missense mutations on mitochondrial function and morphology. *Exp. Neurol.* **219**:266-273.
- [45] Guzmán, J.N.; Sánchez-Padilla, J.; Wokosin, D.; Kondapalli, J.; Ilijic, E.; Schumacker, P.T.; Surmeier, D.J. (2010) Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature.* **468**:696-700.
- [46] Batelli, S.; Albani, D.; Rametta, R.; Polito, L.; Prato, F.; Pesaresi, M.; Negro, A.; Forloni, G. (2008) DJ-1 modulates alpha-synuclein aggregation state in a cellular model of oxidative stress: relevance for Parkinson's disease and involvement of HSP70. *PLoS One.* **3**:e1884.
- [47] Li, W.W.; Yang, R.; Guo, J.C. (2007) Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport.* **8**:1543-1546.

- [48] Liu, G.; Zhang, C.; Yin, J. (2009) alpha-Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neurosci. Lett.* **454**:187-192.
- [49] Bajpai, P.; Sangar, M.C.; Singh, S.; Tang, W.; Bansal, S.; Chowdhury, G.; Cheng, Q.; Fang, J.K.; Martin, M.V.; Guengerich, F.P.; Avadhani, N.G. (2013) Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by mitochondrion-targeted cytochrome P450-2D6: implications in Parkinson disease. *J. Biol. Chem.* **288**:6:4436-4451.
- [50] Ossowska, K.; Smialowska, M.; Kuter, K.; Wieronska, J.; Zieba, B.; Wardas, J.; Nowak, P.; Dabrowska, J.; Bortel, A.; Biedka, I.; Schulze, G.; and Rommelspacher, H. (2006) Degeneration of dopaminergic mesocortical neurons and activation of compensatory processes induced by a long-term paraquat administration in rats: Implications for Parkinson's disease. *Neuroscience.* **141**:4:2155-2165.
- [51] Cleveland, D.W.; Rothstein, J.D. (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**:806-819.
- [52] a) Choi, D.W. (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity, *J. Neurosci.* **7**:369-379. b) Van Den Bosch, L.; Vandenberghe, W.; Klaassen, H.; Van Houtte, E.; Robberecht, W. (2000)  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons, *J. Neurol. Sci.* **180**:29-34.
- [53] Van Den Bosch, L.; Van Damme, P.; Bogaert, E.; Robberecht, W. (2006) The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1762**:1068-1082.
- [54] Appel, S.H. (2001) Calcium: the Darth Vader of ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **2**:Suppl. 1:S47-S54.
- [55] Yáñez, M.; Galán, L.; Matías-Guiu, J.; Vela, A.; Guerrero, A; García, A.G. (2011) CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients produces glutamate independent death of rat motor brain cortical neurons: Protection by resveratrol but not riluzole. *Brain Research.* **1423**:77-86.
- [56] a) Carriedo, S.G.; Sensi, S.L.; Yin, H.Z.; Weiss, J.H. (2000) AMPA exposures induce mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload and ROS generation in spinal motor neurons in vitro. *J. Neurosci.* **20**:240-250. b) Urushitani, M.; Nakamizo, T.; Inoue, R.; Sawada, H.; Kihara, T.; Honda, K.; Akaike, A.; Shimohama, S. (2001) N-methyl-D-aspartate receptor mediated mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload in acute excitotoxic motor neuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after  $\text{Ca}^{2+}$  influx, *J. Neurosci. Res.* **63**:377-387.

- [57] Jaarsma, D.; Rognoni, F.; Van Duijn, W.; Verspaget, H.W.; Haasdijk, E.D.; Holstege, J.C. **(2001)** CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. *Acta Neuropathol.* **102**:293-305.
- [58] Jung, C.; Higgins, C.M.; Xu, Z. **(2002)** Mitochondrial electron transport chain complex dysfunction in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurochem.* **83**:535-545.
- [59] Takeuchi, H.; Kobayashi, Y.; Ishigaki, S.; Doyu, M.; Sobue, G. **(2002)** Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **277**:50966-50972.
- [60] Damiano, M.; Starkov, A.A.; Petri, S.; Kipiani, K.; Kiaei, M.; Mattiazzi, M.; Flint-Beal, M.; Manfredi, G. **(2006)** Neural mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. *J. Neurochem.* **96**:1349-1361.
- [61] Li, S.; Li, X.J. **(2006)** Multiple pathways contribute to the pathogenesis of Huntington disease. *Mol. Neurodegener.* **1**:19.
- [62] Tang, T.S. **(2003)** Huntingtin and huntingtin-associated protein-1 influence neuronal calcium signaling mediated by inositol-(1,4,5)triphosphate receptor type 1. *Neuron.* **39**:227-239.
- [63] Zeron, M.M. **(2002)** Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron.* **33**:849-860.
- [64] Kaltenbach, L.S.; Romero, E.; Becklin, R.R.; Chettier, R.; Bell, R.; Phansalkar, A.; Strand, A.; Torcassi, C.; Savage, J.; Hurlburt, A.; Cha, G.H.; Ukani, L.; Chepanoske, C.L.; Zhen, Y.; Sahasrabudhe, S.; Olson, J.; Kurschner, C.; Ellerby, L.M.; Peltier, J.M.; Botas, J.; Hughes, R.E. **(2007)** Huntingtin interacting proteins are genetic modifiers of neurodegeneration. *PLoS Genet.* **3**:e82.
- [65] Swayne, L.A.; Chen, L.; Hameed, S.; Barr, W.; Charlesworth, E.; Colicos, M.A.; Zamponi, G.W.; Braun, J.E.A. **(2005)** Crosstalk between huntingtin and syntaxin-1A regulates N-type calcium channels. *Mol. Cell. Neurosci.* **30**:339-351.
- [66] Lim, D.; Fedrizzi, L.; Tartari, M.; Zuccato, C.; Cattaneo, E.; Brini, M.; and Carafoli, E. **(2008)** Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease. *J. Biol. Chem.* **283**:5780-5789.
- [67] a) Orr, A.L.; Li, S.; Wang, C.E.; Li, H.; Wang, J.; Rong, J.; Xu, X.; Mastroberardino, P.G.; Greenamyre, J.T.; Li, X.J. **(2008)** N-terminal mutant



- huntingtin associates with mitochondria and impairs mitochondrial trafficking. *J. Neurosci.* **28**:2783-2792. b) Panov, A.V.; Gutekunst, C.A.; Leavitt, B.R.; Hayden, M.R.; Burke, J.R.; Strittmatter, W.J.; Greenamyre, J.T. (2002) Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat. Neurosci.* **5**:731-736.
- [68] Huynh, D.P.; Figueroa, K.; Hoang, N.; Pulst, S.M. (2000) Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat. Genet.* **26**:44-50.
- [69] Magaña, J.J.; Velázquez-Pérez, L.; Cisneros, B. (2013) Spinocerebellar Ataxia Type 2: Clinical Presentation, Molecular Mechanisms, and Therapeutic Perspectives. *Mol. Neurobiol.* **47**:90-104.
- [70] Underwood, B.R.; Rubinsztein, D.C. (2008) Spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions: a review of therapeutic strategies. *Cerebellum.* **7**:2:215-221.
- [71] Catterall, W.A.; Striessnig, J.; Snutch, T.P.; Pérez-Reyes, E. (2003) International Union of Pharmacology. XL. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Calcium Channels. *Pharmacol. Rev.* **55**:579-581.
- [72] Kalia, L.V.; Kalia, S.K.; Salter, M.W. (2008) NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol.* **7**:742-755.
- [73] Williams, K.; Dawson, V.L.; Romano, C.; Dichter, M.A.; Molinoff, P.B. (1990) Characterization of polyamines having agonist, antagonist and inverse agonist effects at the polyamine recognition site of the NMDA receptor. *Neuron.* **5**:199-208.
- [74] Watkins, J.C.; Evans, R.H. (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **21**:165-204.
- [75] Chen, H.S.; Lipton, S.A. (2005) Pharmacological implications of two distinct mechanisms of interaction of memantine with N-methyl-D-aspartate-gated channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314**:961-971.
- [76] Levai, A. (1995) Synthesis of benzothiazepines. *Trends Heterocycl. Chem.* **4**:51-69.
- [77] Levai, A. (2000) Synthesis and Chemical Transformation of 1,5-Benzothiazepines. *J. Heterocycl. Chem.* **37**:199-214.
- [78] Tollefson, M.B.; Kolodziej, S.A.; Fletcher, T.R.; Vernier, W.F.; Beaudry, J.A.; Keller, B.T.; Reitz, D.B. (2003) A Novel Class of Apical Sodium Co-dependent

- Bile Acid Transporter Inhibitors: The 1,2-Benzothiazepines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**:3727-3730.
- [79] Fodor, L.; Csomós, P.; Holczbauer, T.; Kálmán, A.; Csámpai, A.; Sohár, P. (2011) Expected and unexpected reactions of 1,3-benzothiazine derivatives, I. Ring transformation of  $\beta$ -lactam-condensed 1,3-benzothiazines into 4,5-dihydro-1,4-benzothiazepines and indolo-1,4-benzothiazepines. *Tetrahedron Lett.* **52**:224-227.
- [80] Bariwal, J.B.; Upadhyay, K.D.; Manvar, A.T.; Trivedi, J.C.; Singh, J.S.; Jain, K.S.; Shah, A.K. (2008) 1,5-Benzothiazepine, a versatile pharmacophore: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **43**:2279-2290.
- [81] Geyer, H.M.; Watzman, N.; Buckley, J.P. (1970) Effects of a tranquilizer and two antidepressants on learned and unlearned behaviors. *J. Pharm. Sci.* **59**:964-968.
- [82] Baron, K.T.; Thayer, S.A. (1997) CGP37157 modulates mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **340**:295-300.
- [83] Pei, Y.; Lilly, M. J.; Owen, D. J.; D'Souza, J.O.; Tang, X.Q.; Yu, J.; Nazarbaghi, R.; Hunter, A.; Anderson, C.M.; Glasco, S.; Ede, J.N.; James, I.W.; Maitra, U.; Chandrasekaran, S.; Moos, W.H.; Ghosh, S.S. (2003) Efficient Syntheses of Benzothiazepines as Antagonists for the Mitochondrial Sodium–Calcium Exchanger: Potential Therapeutics for Type II Diabetes *J. Org. Chem.* **68**:1:92-103.
- [84] Omelchenko, A.; Bouchard, R.; Le, H.D.; Choptiany, P.; Visen, N.; Hnatowich, M.; Hryshko, L.V. (2003) Inhibition of canine (NCX1.1) and *Drosophila* (CALX1.1)  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers by 7-chloro-3,5-dihydro-5-phenyl-1*H*-4,1-benzothiazepine-2-one (CGP-37157) *J. Pharm. Exp. Therap.* **306**:1050-1057.
- [85] Yang, X.; Buzon, L.; Hamanaka, E.; Liu, K.K.C. (2000) Enzymatic resolution of benzothiazepine for the preparation of squalene synthetase inhibitors *Tetrahedron: Asymmetry*. **11**:4447-4450.
- [86] Miki, T.; Kori, M.; Fujishima, A.; Mabuchi, H.; Tozawa, R.T.; Nakamura, M.; Sugiyama, Y.; Yukimasa, H. (2002) Syntheses of fused heterocyclic compounds and their inhibitory activities for squalene synthase. *Bioorg. Med. Chem.* **10**:2:385-400.
- [87] Angibaud, P.; Bourdrez, X.; Devine, A.; End, D. V.; Freyne, E.; Ligny, Y.; Muller, P.; Mannens, G.; Pilatte, I.; Poncelet, V.; Skrzat, S.; Smets, G.; Van Dun, J.; Van Remoortere, P.; Venet, M.; Wouters, W. (2003) 5-Imidazolyl-quinolinones, -quinazolinones and -benzoazepinones as farnesyltransferase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**:9:1543-1547.

- [88] Phippen, C.B.W.; McErlean, C.S.P. (2011) A 1,5-benzothiazepine synthesis. *Tetrahedron Letters*. **52**:1490-1492.
- [89] Uskokovic, M.; Grethe, G.; Iacobelli, J.; Wenner, W. (1965) The Synthesis of 4,1-Benzothiazepines and 5,1-Benzothiazocines. *J. Org. Chem.* **30**:9:3111-3114.
- [90] Venugopal, V.K.; Rao, N.; Rahman, M.F.; Bhalerao, U.T. (1981) *Indian J. Chem.* **20B**:156.
- [91] a) Kuch, H.; Seidl, G.; Schmitt, K. (1967) *Arch. Pharm.* **300**:4:299. b) Klosa, J. (1967) *J. Prakt. Chem.(Leipzig)*. **3**:1-2:5. c) Yukimasa, H.; Miki, T. (1996) *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*. **16**.
- [92] Hirai, K.S.; Matsutani, T.; Ishiba, I. (1981) *U.S. Patent* **4**:297-280.
- [93] a) Turner, J.A. (1990) A general approach to the synthesis of 1,6-, 1,7-, and 1,8-naphthyridines. *J. Org. Chem.* **55**:4744-4750. b) Úbeda, J.I.; Villacampa, M.; Avendaño, C. (1998) Friedländer Synthesis of Substituted Quinolines from N-Pivaloylanilines. *Synthesis*. **8**:1176-1180.
- [94] Tu, S.J.; Cao, X.D.; Hao, W.J.; Zhang, X.H.; Yan, S.; Wu, S.S.; Han, Z.G.; Shi, F. (2009) An efficient and chemoselective synthesis of benzo[e][1,4]thiazepin-2-(1*H*,3*H*,5*H*)-ones via a microwave-assisted multi-component reaction in water. *Org. Biomol. Chem.* **7**:557-563.
- [95] Patrick, G.L. (2009) An introduction to Medicinal Chemistry. *Editorial Oxford University Press*.
- [96] Delgado-Cirilo, A.; Minguillón-Llombart, C.; Joglar-Tamargo, J. (2000) Introducción a la Química Terapéutica. *Editorial Promociones y Publicaciones Universitarias*.
- [97] Hadjipavlou-Litina, D.; Garg, R.; Hansch, C. (2004) Comparative Quantitative Structure-Activity Relationship Studies (QSAR) on Non-Benzodiazepine Compounds Binding to Benzodiazepine Receptor (BzR). *Chem. Rev.* **104**:3751-3793.
- [98] Carafoli, E.; Tiozzo, R.; Lugli, G.; Crovetti, F.; Kratzing, C. (1974) The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **6**:4:361-371.
- [99] Carafoli, E.; Malmstrom, K.; Sigel, E.; Crompton, M. (1976) The regulation of intracellular calcium. *Clinical Endocrinology*. **5**:S49-S59.
- [100] Blaustein, M.P.; Lederer, W.J. (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol. Rev.* **79**:3:763-854.

- [101] Crompton, M.; Kunzi, M.; Carafoli, E. (1977) The calcium-induced and sodium-induced effluxes of calcium from heart mitochondria. Evidence for a sodium-calcium carrier. *Eur. J. Biochem. FEBS*. **79**:2:549-558.
- [102] Minelli, A. (2007) Cellular and subcellular localization of  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium*. **41**:3:221-234.
- [103] Paucek, P.; Jaburek, M. (2004) Kinetics and ion specificity of  $\text{Na}(+)/\text{Ca}(2+)$  exchange mediated by the reconstituted beef heart mitochondrial  $\text{Na}(+)/\text{Ca}(2+)$  antiporter. *Biochem. Biophys. Acta*. **1659**:1:83-91.
- [104] Ohana, E. (2004) A sodium zinc exchange mechanism is mediating extrusion of zinc in mammalian cells. *J. Biol. Chem*. **279**:6:4278-4284.
- [105] Cai, X.; Lytton, J. (2004) The cation/ $\text{Ca}(2+)$  exchanger superfamily: phylogenetic analysis and structural implications. *Mol. Bio. Evo*. **21**:9:1692-1703.
- [106] Chiesi, M.; Schwaller, R.; Eichenberger, K. (1988) Structural dependency of the inhibitory action of benzodiazepines and related compounds on the mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger. *Biochem. Pharmacol*. **37**:22:4399-4403.
- [107] Vaghy, P.L.; Johnson, J.D.; Matlib, M.A.; Wang, T.; Schwartz, A. (1982) Selective inhibition of  $\text{Na}^+$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release from heart mitochondria by diltiazem and certain other  $\text{Ca}^{2+}$  antagonist drugs. *J. Bio. Chem*. **257**:11:6000-6002.
- [108] Kinnally, K.W. (1993) Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**:4:1374-1378.
- [109] Czyz, A.; Kiedrowski, L. (2003) Inhibition of plasmalemmal  $\text{Na}(+)/\text{Ca}(2+)$  exchange by mitochondrial  $\text{Na}(+)/\text{Ca}(2+)$  exchange inhibitor 7-chloro-5-(2'-chlorophenyl)-1,5-dihydro-4,1-benzothiazepin-2(3H)-one (CGP37157) in cerebellar granule cells. *Biochem. Pharma*. **66**:12:2409-2411.
- [110] Cox, D.A.; Conforti, L.; Sperelakis, N.; Matlib, M.A. (1993) Selectivity of inhibition of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange of heart mitochondria by benzothiazepine CGP37157 *J. Card. Pharm*. **21**:595-599.
- [111] Cox, D.A.; Matlib, M.A. (1993) Modulation of intramitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by antagonists of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange. *Trends Pharmacol. Sci*. **14**:408-413.

- [112] White, R.J.; Reynolds, I.J. (1997) Mitochondria accumulate  $\text{Ca}^{2+}$  following intense glutamate stimulation of cultured rat forebrain neurones. *J. Physiology*. **498**:1:31-47.
- [113] Baron, K.T.; Thayer, S.A. (1997) CGP37157 modulates mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *Eur. J. Pharm.* **340**:295-300.
- [114] Wollheim, C.B. (2000) Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in Type II diabetes. *Diabetologia*. **43**:265-277.
- [115] Nicolau, S.M. (2010) La mitocondria, una diana para la neuroprotección farmacológica. *Tesis Doctoral, UAM*.
- [116] Thayer, S.A.; Miller, R.J. (1990) Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *J. Physiol.* **425**:85-115.
- [117] Peng, T.I.; Jou, M.J. (2010) Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1201**:183-188.
- [118] Lai, J.C.; Cooper, A.J. (1986) Brain alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution, and effects of inhibitors. *J. Neurochem.* **47**:1376-1386.
- [119] Zhang, S.; Hedskog, L.; Petersen, C.A.; Winblad, B.; Ankarcrona, M. (2010) Dimebon (latrepirdine) enhances mitochondrial function and protects neuronal cells from death. *J. Alzheimers. Dis.* **21**:389-402.
- [120] Nicholls, D.G. (1985) A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload? *Prog. Brain Res.* **63**:97-106.
- [121] White, R.J.; Reynolds, I.J. (1995) Mitochondrial and  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* **15**:2:1318-1328.
- [122] Tidwell, T.T. (2001) Wilhelm Schlenk: The Man Behind the Flask. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**:331-337.
- [123] Armarego, W.L.F.; Chai, C.L.L. (2009) Purification of Laboratory Chemicals, *Pergamon Press*: Oxford.
- [124] Biedler, J.L.; Roffler-Tarlov, S.; Schachner, M.; Freedman, L.S. (1978) Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Res.* **38**:3751-3757.

- [125] Ross, R.A.; Spengler, B.A.; Biedler, J.L. (1983) Coordinate Morphological and Biochemical Interconversion of Human Neuroblastoma Cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **71**:741-747.
- [126] Macville, M.; Schröck, E.; Padilla-Nash, H. (1999) Comprehensive and definitive molecular cytogenetic characterization of HeLa cells by spectral karyotyping. *Cancer Res.* **59**:1:141-50.
- [127] Livett, B.G. (1984) Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol. Rev.* **64**:1103-1161.
- [128] a) Moro M.A.; Lopez, M.G.; Gandía, L.; Michelena, P.; Garcia, A.G. (1990) Separation and culture of living adrenaline- and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Anal. Biochem.* **185**:243-248. b) Moro, M.A.; Garcia, A.G.; Langley, O.K. (1991) Characterization of two chromaffin cell populations isolated from bovine adrenal medulla. *J. Neurochem.* **57**:363-369.
- [129] Wilson, S.P. (1987) Purification of adrenal chromaffin cells on Renografin gradients. *J. Neurosci. Methods.* **19**:163-171.
- [130] Egea, J.; Rosa, A.O.; Sobrado, M.; Gandía, L.; López, M.G.; García, A.G. (2007) Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice. *Neuroscience.* **145**:866-872.
- [131] Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
- [132] Denizot, F.; Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* **89**:271-277.
- [133] a) Koh, J.Y.; Choi, D.W. (1987) Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Methods.* **20**:83-90. b) Sobrado, M.; Roda, J.M.; López, M.G.; Egea, J.; García, A.G.; (2004) Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen-glucose deprivation. *Neurosci. Lett.* **365**:132-136.
- [134] Cano-Abad, M.F.; López, M.G.; Hernández-Guijo, J.M.; Zapater, P.; Gandía, L.; Sánchez-García, P.; García, A.G. (1998) Effects of the neuroprotectant lubeluzole on the cytotoxic actions of veratridine, barium, ouabain and 6-hydroxydopamine in chromaffin cells. *Br. J. Pharmacol.* **124**:1187-1196.

- [135] Rudolf, R.; Mongillo, M.; Rizzuto, R.; Pozzan, T. (2003) Looking forward to seeing calcium. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**:579-586.
- [136] Inouye, S.; Noguchi, M.; Sakaki, Y.; Takagi, Y.; Miyata, T.; Iwanaga, S.; Miyata, T.; Tsuji, F.I. (1985) Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:10:3154-3158.
- [137] Rizzuto, R.; Brini, M.; Murgia, M.; Pozzan, T. (1993) Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to  $\text{IP}_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* **262**:744-747.
- [138] Brini, M.; Pinton, P.; Pozzan, T.; Rizzuto, R. (1999). Targeted recombinant aequorins: Tools for monitoring  $[\text{Ca}^{2+}]$  in various compartments of a living cell. *Microsc. Res. Tech.* **46**:380-389.
- [139] Abdessamad, A.; Schmidt, F.; Sarr, M.; Decaudin, D.; Florent, J.C.; Johannes, L. (2008) Synthesis and Properties of a Mitochondrial Peripheral Benzodiazepine Receptor Conjugate. *Chem. Med. Chem.* **3**:1687-1695.
- [140] Smith, M.B. (2010) Organic Synthesis (Third Edition) Chapter 7, Protecting Groups, *Academic Press, Elsevier*. pages 587-622.
- [141] Gschwend, H.W.; Rodriguez, H.R. (2005) Heteroatom-Facilitated Lithiations *Organic Reactions.* **26**:1:1-360.
- [142] Clayden, J. (2002) Organolithiums: Selectivity for Synthesis. *Ed. Pergamon*.
- [143] Balci, M. (2005) Basic  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR Spectroscopy, 1st Edition. *Elsevier Science*.
- [144] Turner, J.A. (1983) Regiospecific Electrophilic Substitution of Aminopyridines: Ortho Lithiation of 2-, 3-, and 4-(Pivaloylamino)pyridines. *J. Org. Chem.* **48**:3401-3408.
- [145] Kilpatrick, D.L.; Slepatis, R.J.; Corcoran, J.J.; Kirshner, N. (1982) Calcium uptake and catecholamine secretion by cultured bovine adrenal medulla cells. *J. Neurochem.* **38**:427-435.
- [146] Jordán, J.; Galindo, M.F.; Calvo, S.; González-García, C.; Ceña, V. (2000) Veratridine induces apoptotic death in bovine chromaffin cells through superoxide production. *Br. J. Pharmacol.* **130**:1496-1504.
- [147] Nicolau, S.M.; de Diego, A.M.G.; Cortés, L.; Egea, J.; González, J.C.; Mosquera, M.; López, M.G.; Hernández-Guijo, J.M.; García, A.G. (2009) Mitochondrial

- Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> Exchanger blocker CGP37157 protects against chromaffin cell death elicited by veratridine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **330**:844-872.
- [148] González-Lafuente, L.; Egea, J.; León, R.; Martínez-Sanz, F.J.; Monjas, L.; Perez, C.; Merino, C.; García-De Diego, A.M.; Rodríguez-Franco, M.I.; García, A.G.; Villarroja, M.; López, M.G.; De Los Ríos, C. (2012) Benzothiazepine CGP37157 and its isosteric 2'-methyl analogue provide neuroprotection and block cell calcium entry. *ACS. Chem. Neurosci.* **3**:519-529.
- [149] Cano-Abad, M.F.; Villarroja, M.; García, A.G.; Gabilan, N.H.; López, M.G. (2001) Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. *J. Biol. Chem.* **276**:39695-39704.
- [150] Neumann, J.T.; Diaz-Sylvester, P.L.; Fleischer, S.; Copello, J.A. (2011) CGP37157 inhibits the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and activates ryanodine receptor channels in striated muscle. *Mol. Pharmacol.* **79**:141-147.
- [151] Ruiz, A.; Alberdi, E.; Matute, C. (2014) CGP37157, an inhibitor of the mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, protects neurons from excitotoxicity by blocking voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Cell Death Dis.* **5**:e1156.
- [152] Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* **1**:623-634.
- [153] Abramov, A.Y.; Duchen, M.R. (2010) Impaired mitochondrial bioenergetics determines glutamate-induced delayed calcium deregulation in neurons. *Biochim. Biophys. Acta.* **1800**:297-304.
- [154] Stout, A.K.; Raphael, H.M.; Kanterewicz, B.I.; Klann, E.; Reynolds, I.J. (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat. Neurosci.* **1**:366-373.
- [155] a) Stanika, R.I.; Pivovarova, N.B.; Brantner, C.A.; Watts, C.A.; Winters, C.A.; Andrews, S.B. (2009) Coupling diverse routes of calcium entry to mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**:9854-9859. b) Starkov, A.A.; Chinopoulos, C.; Fiskum, G. (2004) Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium.* **36**:257-264.
- [156] Wang, K.K. (2000) Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* **23**:20-26.
- [157] a) Brewer, L.D.; Thibault, O.; Staton, J.; Thibault, V.; Rogers, J.T.; García-Ramos, G. (2007) Increased vulnerability of hippocampal neurons with age in culture: temporal association with increases in NMDA receptor current, NR2A



- subunit expression and recruitment of L-type calcium channels. *Brain. Res.* **1151**:20-31. b) Prehn, J.H.; Lippert, K.; Kriegstein, J. (1995) Are NMDA or AMPA/kainate receptor antagonists more efficacious in the delayed treatment of excitotoxic neuronal injury? *Eur. J. Pharmacol.* **292**:179-189.
- [158] Nicolau, S.M.; Egea, J.; López, M.G.; García, A.G. (2010) Mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger, a new target for neuroprotection in rat hippocampal slices. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **400**:140-144.
- [159] Olanow, C.A. (1993) A Radical Hypothesis for neurodegeneration. *TINS.* **16**:439-444.
- [160] Galkin, A.; Abramov, A.Y.; Frakich, N.; Duchon, M.R.; Moncada, S. (2009) Lack of oxygen deactivates mitochondrial complex I: implications for ischemic injury? *J. Biol. Chem.* **284**:36055-36061.
- [161] Hernández-SanMiguel, E.; Vay, L.; Santo-Domingo, J.; Lobatón, C.D.; Moreno, A.; Montero, M.; Alvarez, J. (2006) The mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger plays a key role in the control of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  oscillations. *Cell Calcium.* **40**:53-61.
- [162] Hernansanz-Agustín, P.; Izquierdo-Álvarez, A.; Sánchez-Gómez, F.J.; Ramos, E.; Villa-Peña, T.; Lamas, S.; Bogdanova, A.; Martínez-Ruiz, A. (2014) Acute hypoxia produces a superoxide burst in cell. *Free Radical Biology and Medicine.* **71**:146-156.



## 8. - Anexos

---

<b>8.1. - Anexos</b>	<b>227</b>
8.1.1. - <i>Caracterización estructural del benzoderivado de CGP37157</i>	229
8.1.1.1. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del compuesto 2</i>	229
8.1.1.2. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del intermedio 12</i>	230
8.1.1.3. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del compuesto 23</i>	231
8.1.1.4. - <i>Espectroscopía de <math>^{13}\text{C}</math>-RMN del compuesto 23</i>	232
8.1.1.5. - <i>Espectroscopía de FTIR del compuesto 23</i>	233
8.1.2. - <i>Caracterización estructural del piridoderivado de CGP37157</i>	234
8.1.2.1. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del compuesto 3</i>	234
8.1.2.2. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del intermedio 32</i>	235
8.1.2.3. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del intermedio 43</i>	236
8.1.2.4. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del intermedio 54</i>	237
8.1.2.5. - <i>Espectroscopía de <math>^1\text{H}</math>-RMN del compuesto 65</i>	238
8.1.2.6. - <i>Espectroscopía de <math>^{13}\text{C}</math>-RMN del compuesto 65</i>	239
8.1.2.7. - <i>Espectroscopía de FTIR del compuesto 65</i>	240



## 8. - Anexos

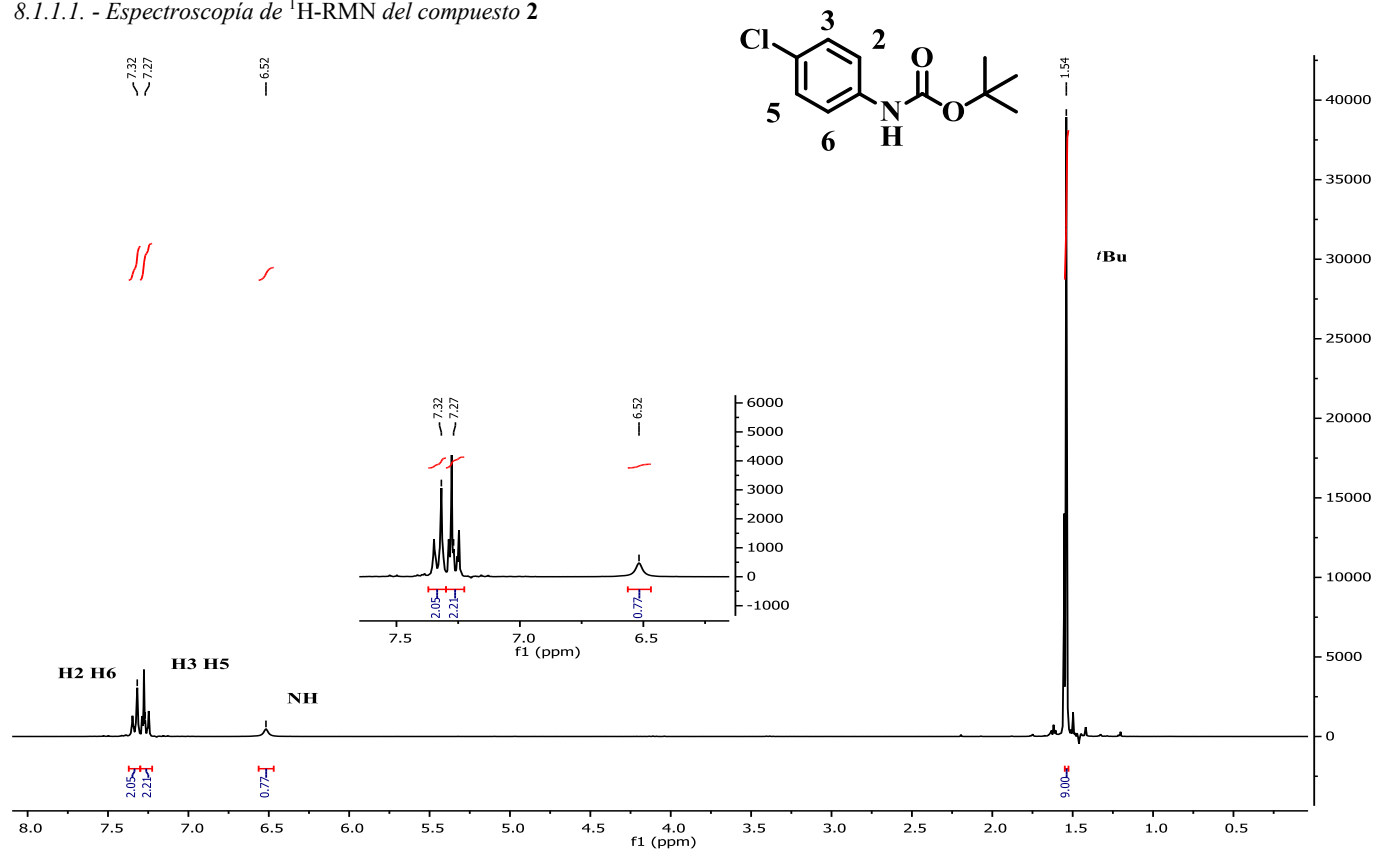
### 8.1. - Anexos

En el apartado de anexos describiremos los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y FTIR de los derivados bencénicos, **2**, **12**, **23** y de los derivados piridínicos **3**, **32**, **43**, **54**, **65**.

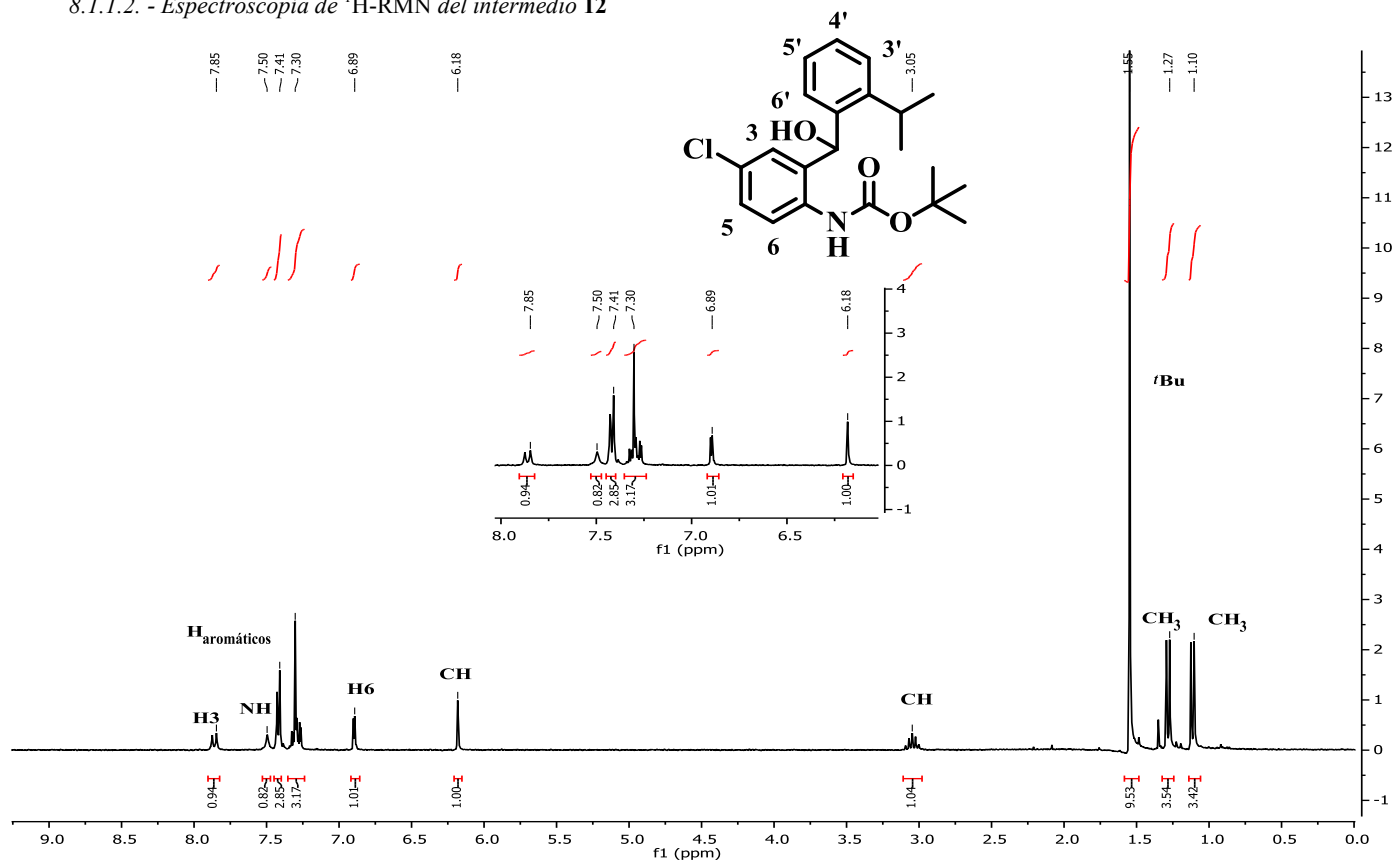


### 8.1.1. - Caracterización estructural del benzoderivado de **CGP37157**

#### 8.1.1.1. - Espectroscopía de $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **2**

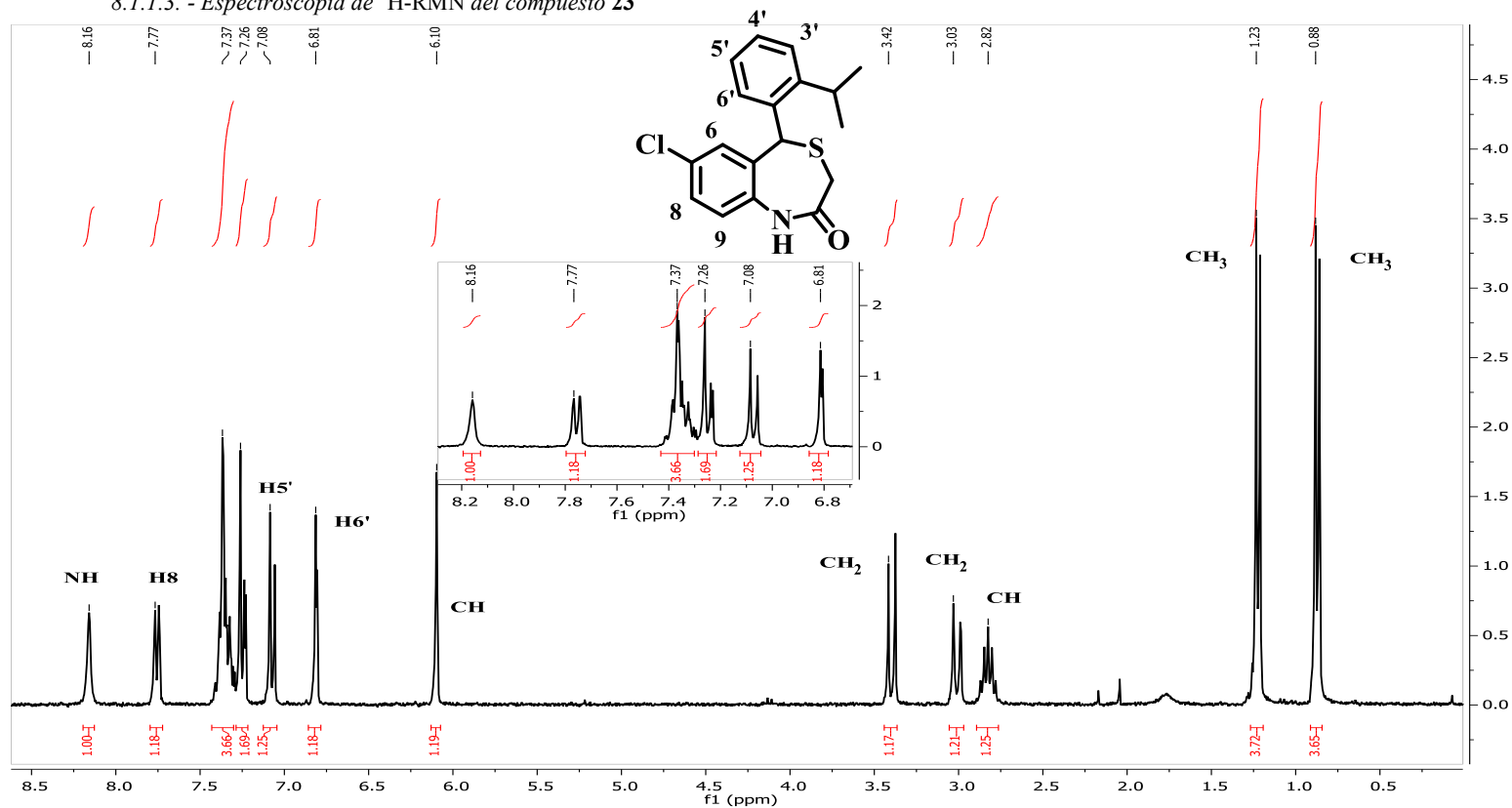


$^1\text{H}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm)=7,32 (dd, 2H,  $^3J=8,6$  Hz, H2, H6), 7,27 (dd, 2H,  $^3J=8,6$  Hz, H3, H5), 6,52 (bs, 1H, NH), 1,54 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>)

8.1.1.2. - Espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN del intermedio 12

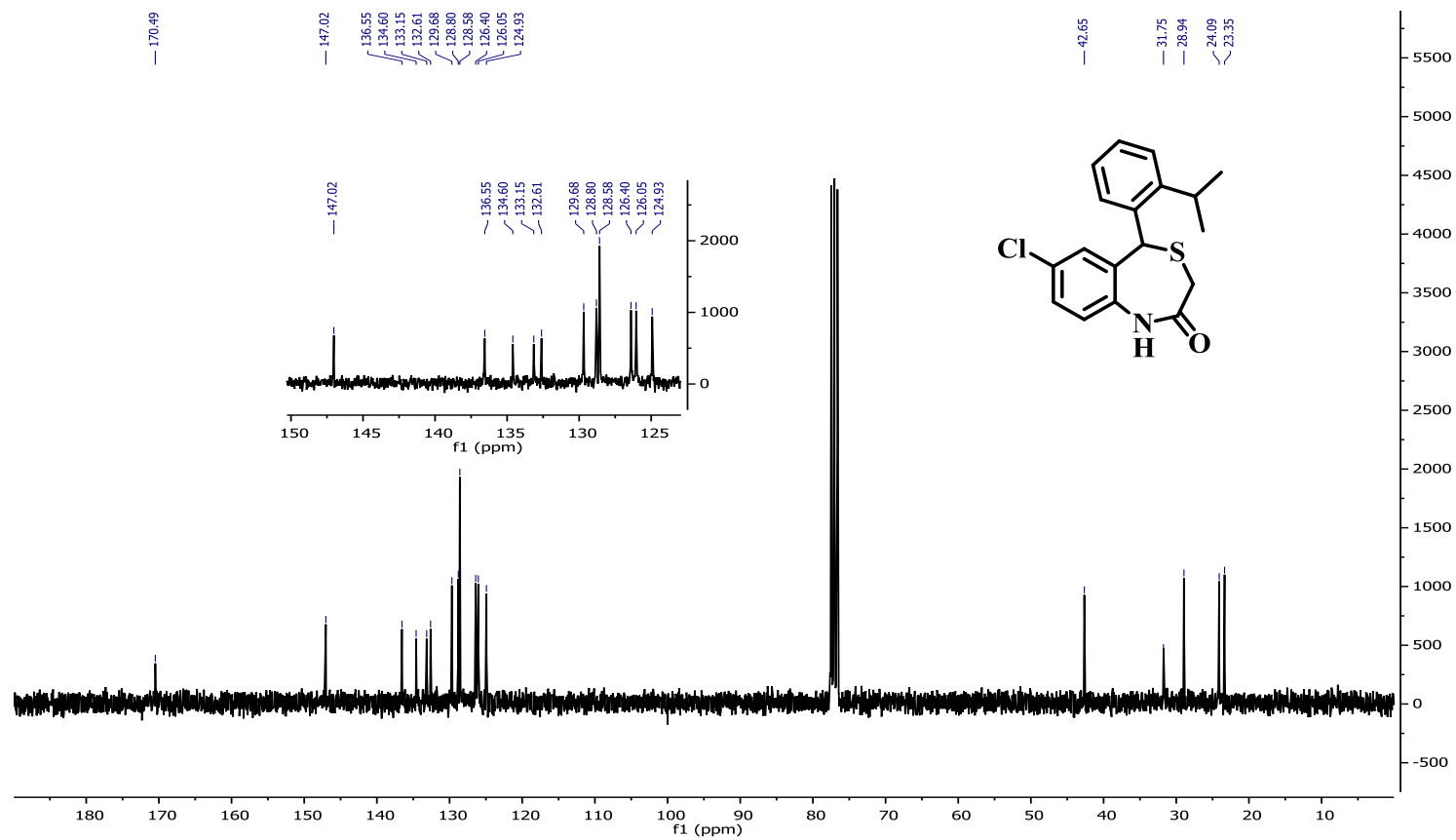
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,85 (d, 1H,  $^4J = 2,3$  Hz, H3), 7,50 (s, 1H, NH), 7,41-7,30 (m, 5H,  $\text{H}_{\text{aromáticos}}$ ), 6,89 (d, 1H,  $^3J = 8,6$  Hz, H6), 6,18 (s, 1H, CH), 3,05 (hp, 1H  $^3J = 7,0$  Hz, CH), 1,55 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ), 1,27 (d, 3H,  $^3J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 1,10 ppm (d, 3H,  $^3J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ).



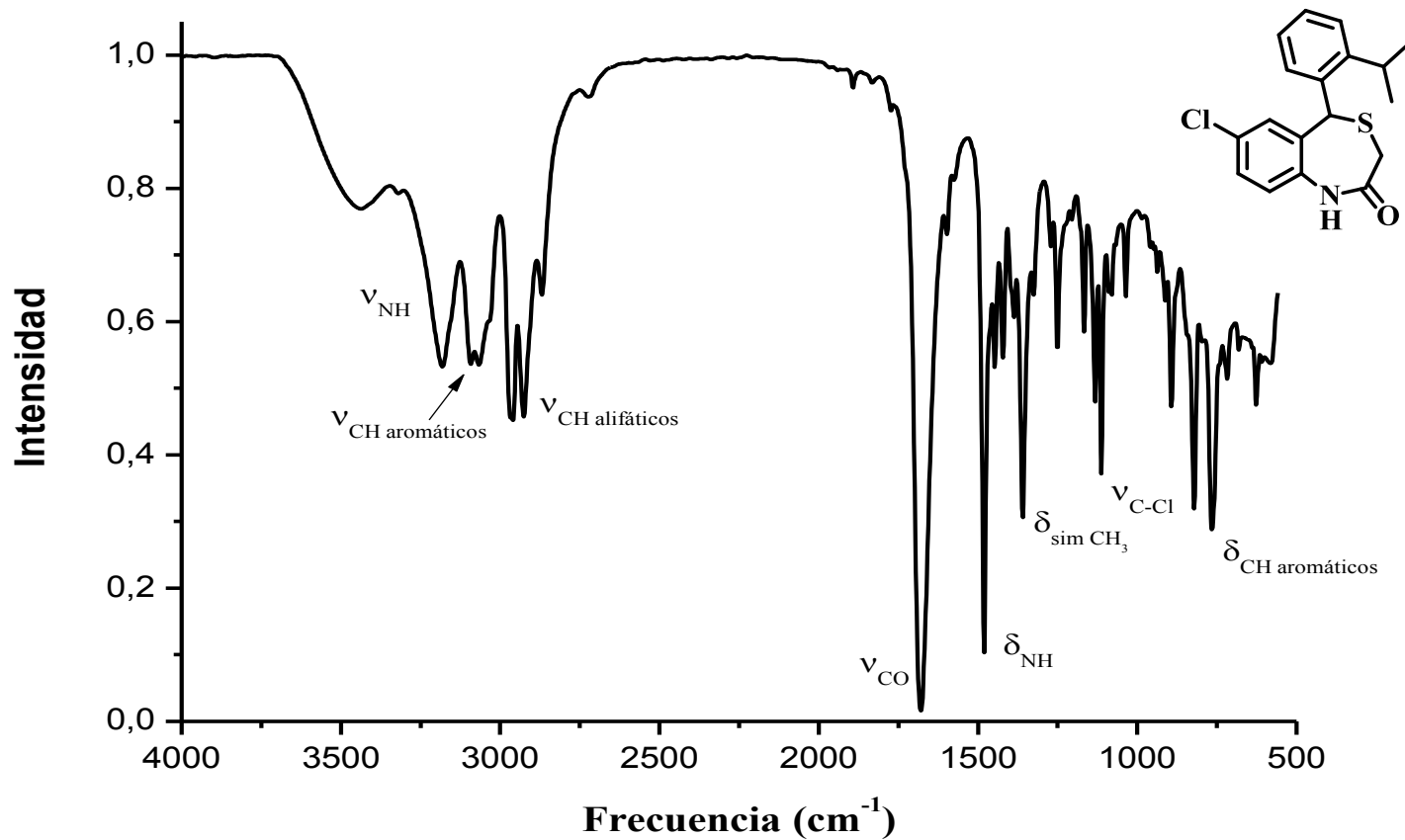
8.1.1.3. - Espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **23**

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,16 (s, 1H, NH), 7,73 (dd, 1H,  $^3J=8,5/1,8$  Hz, H9), 7,36 (m, 3H, H<sub>aromáticos</sub>), 7,24, (dd, 1H,  $^3J=8,5/4J=1,8$  Hz, H8), 7,03 (d, 1H,  $^3J=8,5$  Hz, H3'), 6,82, (d, 1H,  $^4J=1,8$  Hz, H6), 6,08 (s, 1H, CH), 3,36 (d, 1H,  $^2J=12,1$  Hz, CH<sub>2</sub>), 3,00 (d, 1H,  $^2J=12,1$  Hz, CH<sub>2</sub>), 2,81, (hp, 1H,  $^3J=6,5$  Hz, CH), 1,23 (d, 3H,  $^3J=6,5$  Hz, CH<sub>3</sub>), 0,86 (d, 3H,  $^3J=6,5$  Hz, CH<sub>3</sub>).

#### 8.1.1.4. - Espectroscopia de $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto **23**



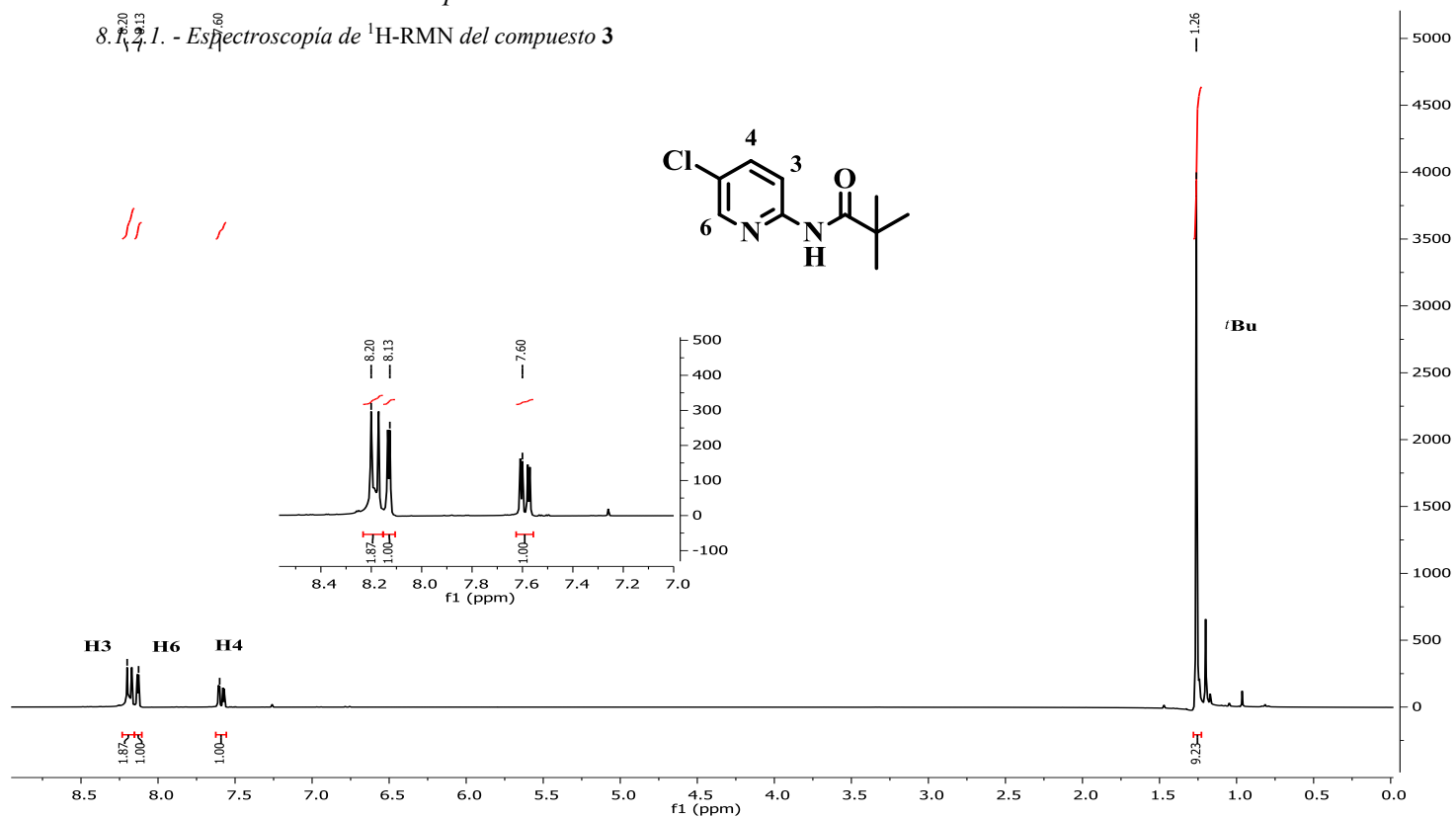
$^{13}\text{C}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 23,3; 24,0; 28,9; 31,7; 42,6; 124,9; 126,0; 126,4; 128,5; 128,8; 129,6; 132,6; 133,1; 134,6; 136,5; 147,0; 170,4.

8.1.1.5. - Espectroscopia de FTIR del compuesto **23**

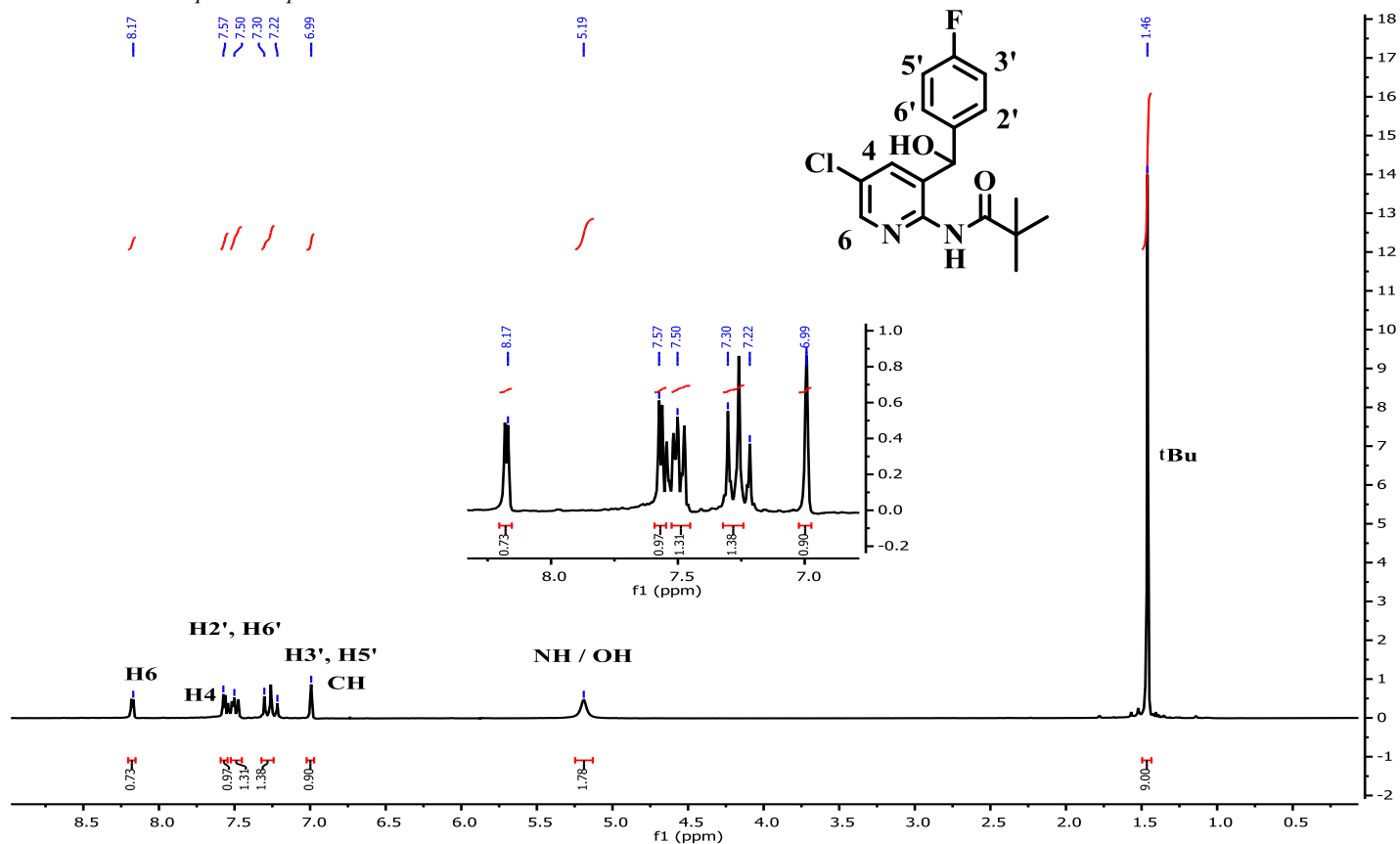
$\nu_{\text{NH(st)}}=3433,8 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CHaromáticos(st)}}=3085,4 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CHalifáticos(st)}}=2927,4 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CO(st)}}=1681,6 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\delta_{\text{NH}}=1484,9 \text{ cm}^{-1}$ .  $\delta_{\text{CH(sim)}}=1354,5 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{C-Cl}}=1118,9 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\delta_{\text{CHaromáticos}}=766,3 \text{ cm}^{-1}$ .

### 8.1.2. - Caracterización estructural del piridoderivado de **CGP37157**

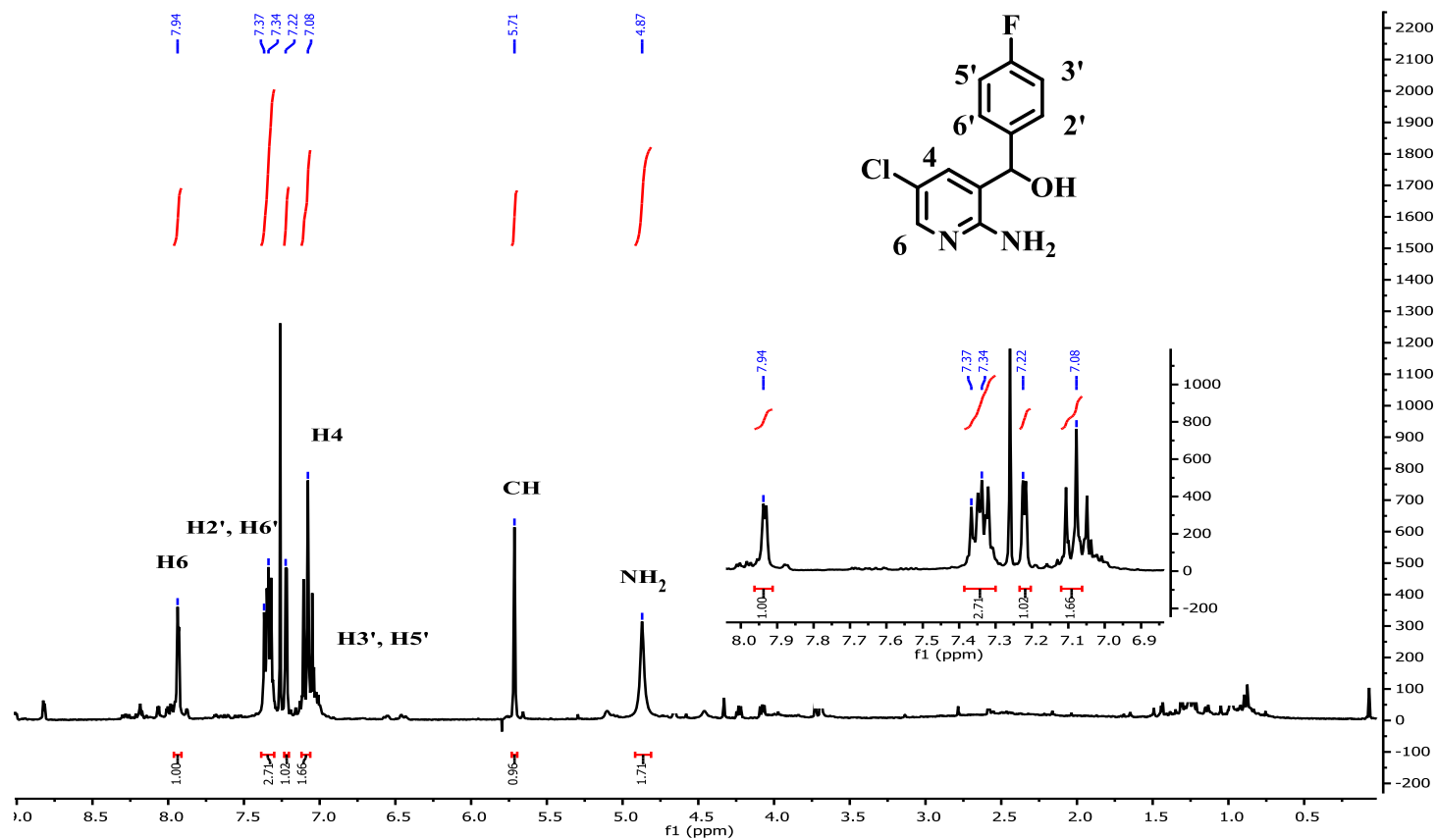
#### 8.1.2.1. - Espectroscopia de $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **3**



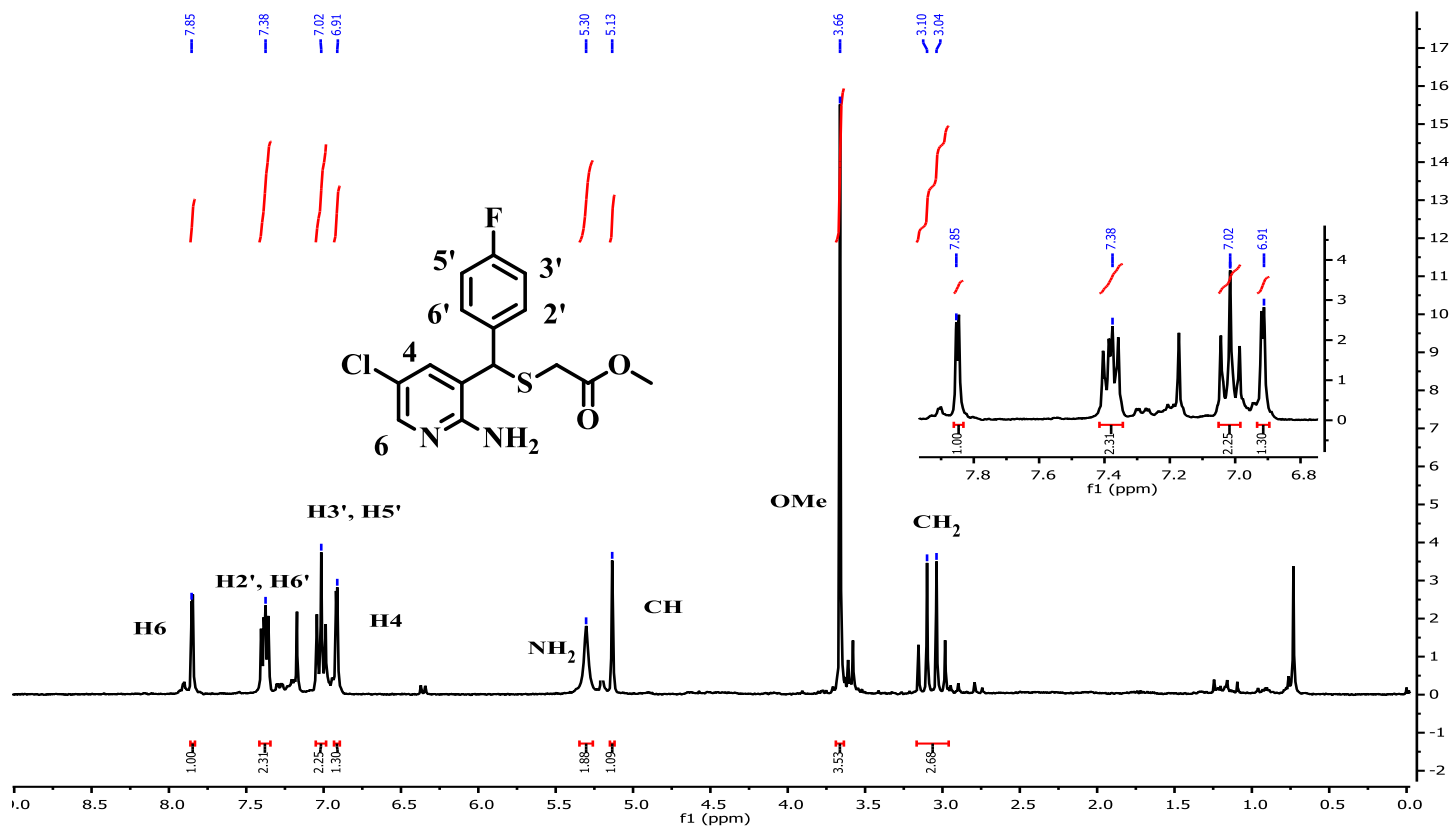
$^1\text{H}$ -RMN (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) = 8,20 (d, 1H,  $^3J=8,8$  Hz, H3), 8,17 (bs, 1H, NH), 8,13 (d,  $^4J=2,6$  Hz, H6, 1H), 7,60 (dd, 1H,  $^3J=8,8/{}^4J=2,6$  Hz, H4), 1,26 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>).

8.1.2.2. - Espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN del intermedio 32

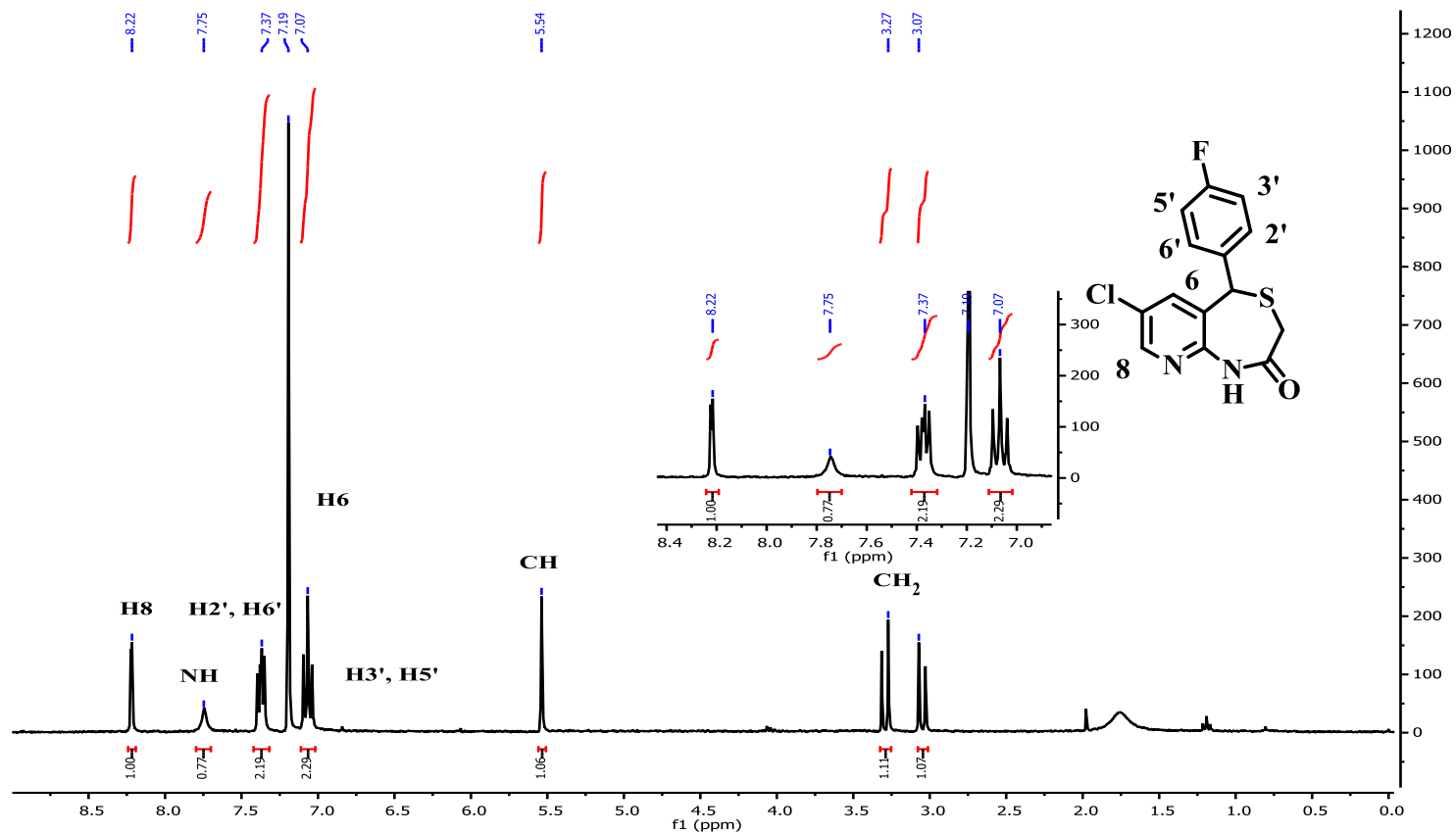
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,17 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,57 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,50 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H2', H6'), 7,30 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3', H5'), 6,99 (s, 1H, CH), 5,19 (bs, 2H, NH, OH), 1,49 (s, 9H ( $\text{CH}_3$ )<sub>3</sub>).

8.1.2.3. - Espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN del intermedio **43**

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,94 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,22 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 7,37 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H2', H6'), 7,08 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3', H5'), 5,71 (s, 1H, CH), 4,87 (bs, 2H,  $\text{NH}_2$ ).

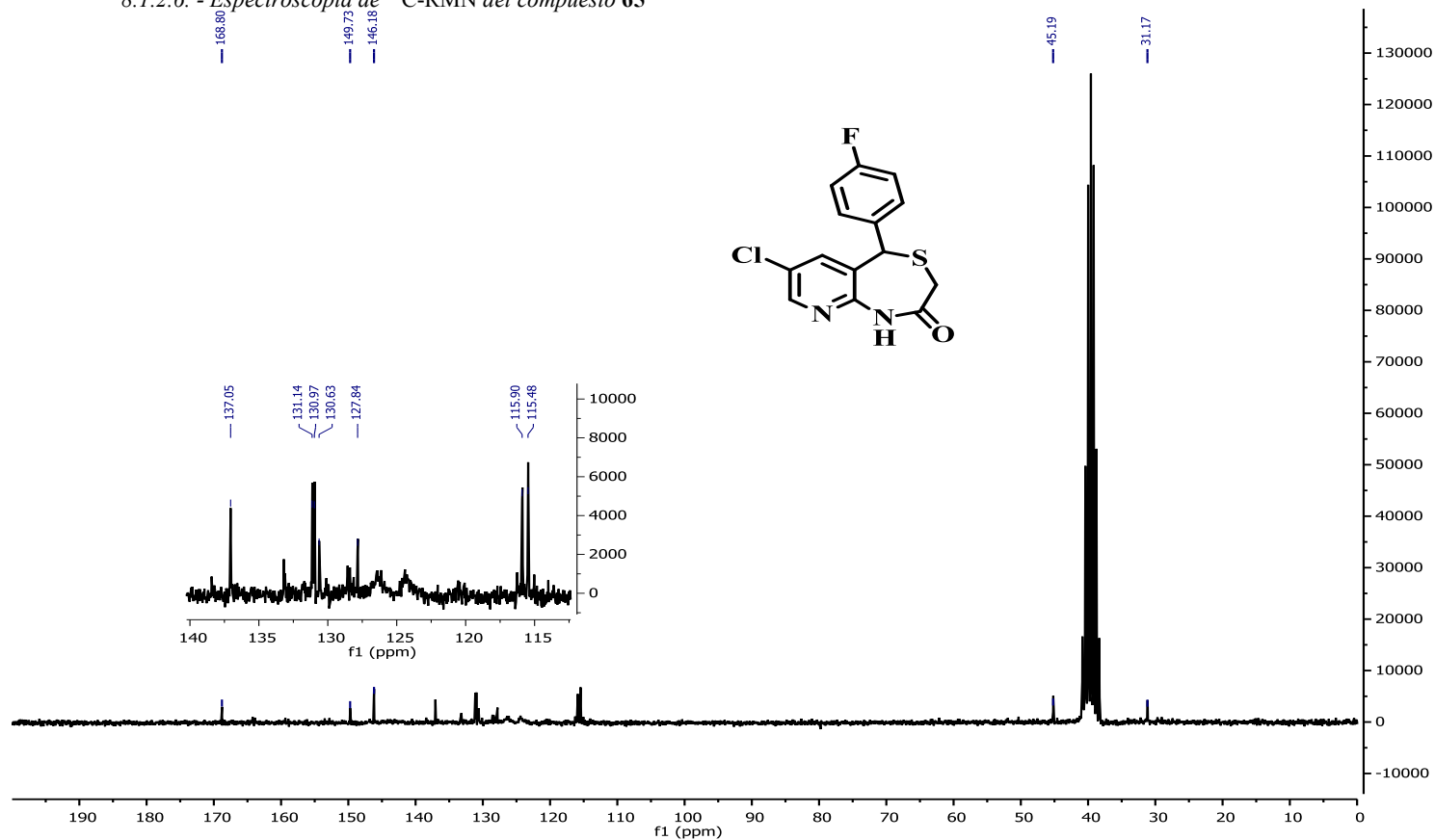
8.1.2.4. - Espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN del intermedio **54**

$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 7,85 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H6), 7,37 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H2', H6'), 7,01 (d, 2H,  $^3J = 8,5$  Hz, H3', H5'), 6,91 (d, 1H,  $^4J = 1,8$  Hz, H4), 5,30 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 5,13 (s, 1H, CH), 3,66 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,09 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz, CH<sub>2</sub>). 3,08 (d, 1H,  $^2J = 12,1$  Hz, CH<sub>2</sub>).

8.1.2.5. - Espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **65**

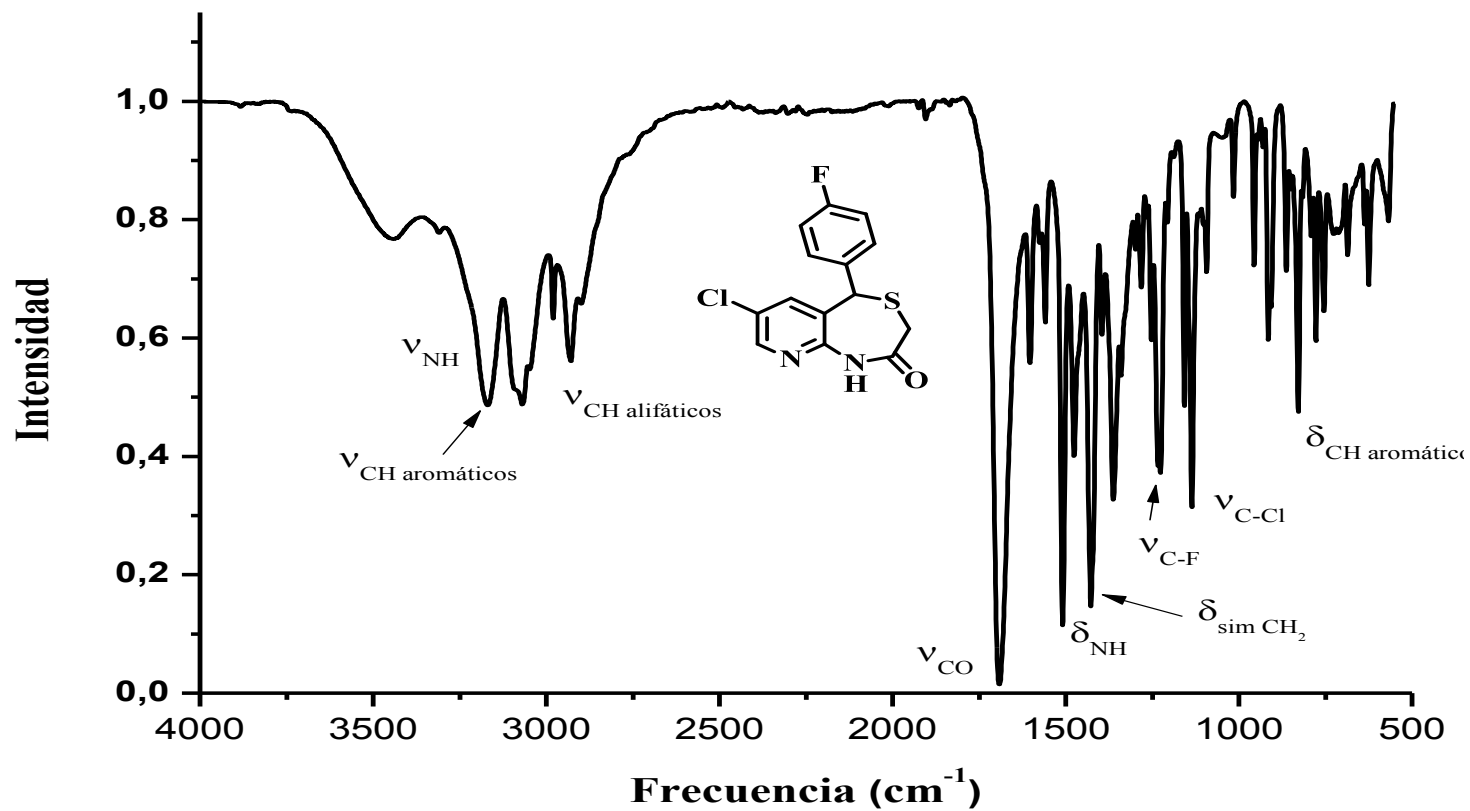
$^1\text{H}$ -RMN (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) = 8,21 (d, 1H,  $^4J$  = 1,8 Hz, H8), 7,74 (bs, 1H, NH), 7,36 (d, 2H,  $^3J$  = 8,5 Hz, H2', H6'), 7,30 (d, 1H,  $^4J$  = 1,8 Hz, H6), 7,06 (d, 2H,  $^3J$  = 8,5 Hz, H3', H5'), 5,53 (s, 1H, CH), 3,27 (d, 1H,  $^2J$  = 12,1 Hz, CH<sub>2</sub>), 3,07 (d, 1H,  $^2J$  = 12,1 Hz, CH<sub>2</sub>).



8.1.2.6. - Espectroscopia de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto **65**

$^{13}\text{C}$ -RMN (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) = 31,1; 45,1; 115,4; 115,9; 127,8; 130,6; 130,9; 131,1; 133,1; 137,0; 146,1; 149,7; 161,7; 168,8.

## 8.1.2.7. - Espectroscopia de FTIR del compuesto 65



$\nu_{\text{NH(st)}}=3415,3 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CHaromáticos(st)}}=3172,3 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CHalifáticos(st)}}=2925,4 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{CO(st)}}=1687,4 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\delta_{\text{NH}}=1507,1 \text{ cm}^{-1}$ .  $\delta_{\text{CH(sim)}}=1427,6 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{C-F}}=1227,5 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{C-Cl}}=1134,9 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\delta_{\text{CHaromáticos}}=830,2 \text{ cm}^{-1}$ .

